

Aus der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. M. Hannig

***In situ* Untersuchungen zur initialen
Biofilmbildung auf Dentin unter dem Einfluss von
Hydroxylapatit-haltiger Zahnpasta**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2019

vorgelegt von:
Nadine Limbach
geb. am 05.01.1989 in Homburg Saar

Tag der Promotion:

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. M. D. Menger

Prof. Dr. S. Rupf

Meinen Eltern und meiner Schwester zu Ehren

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
1.1	Deutsche Zusammenfassung	1
1.2	Abstract	3
2	Einleitung	5
2.1	Literaturübersicht	5
2.1.1	Dentin	5
2.1.2	Biofilme	6
2.1.3	Biofilmanagement/Beeinflussung des Biofilms	10
2.2	Ziel der Arbeit / Fragestellung	17
3	Material und Methode	18
3.1	Versuchsaufbau	18
3.2	Studiendesign	19
3.2.1	Probanden	19
3.2.2	Prüfkörper-(PK)- und Schienenherstellung	19
3.2.3	Prüfprodukte	22
3.2.4	Biofilmgewinnung	23
3.3	Untersuchungsmethoden	24
3.3.1	Fluoreszenzmikroskopie	24
3.3.2	Rasterelektronenmikroskopie	27
3.4	Statistik	28
4	Ergebnisse	29
4.1	Untersuchungen mit dem Fluoreszenzmikroskop	29
4.1.1	Anordnung der Bakterien	29
4.1.2	Biofilmmenge	31
4.1.3	Vitalitätsbestimmung	37
4.2	Biofilmanalyse mit dem Rasterelektronenmikroskop	40
4.3	Analyse der Biofilme und der Zahnpastarückstände	48
5	Diskussion	56
5.1	Methodik	56
5.1.1	Fragestellung und Studiendesign	56
5.1.2	Herstellung und Verwendung der bovinen Prüfkörper	57

5.1.3	Probandenauswahl	58
5.1.4	Biofilmgewinnung	58
5.1.5	Untersuchung des Biofilms	60
5.1.6	Scoring der Biofilmmenge und Vitalität der Bakterien	60
5.1.7	REM / EDX	61
5.2	Diskussion der Ergebnisse	61
5.3	Schlussfolgerung	65
6	Literaturverzeichnis	66
7	Publikation / Danksagung	79
7.1	Publikation	79
7.2	Danksagung	79
Anhang	80

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Zielstellung: Hydroxylapatit (HA) wird in Zahnpasten als Putzkörper eingesetzt. Aktuell wird die Eignung von HA-Nanopartikeln zur Remineralisation der Zahnhartsubstanz bei initialer Karies diskutiert. In der vorliegenden Studie soll die Wirkung von HA auf die initiale Biofilmbildung auf Dentin sowie ein möglicher Materialeintrag in die Dentintubuli untersucht werden.

Material und Methode: Um die Wirkung von verschiedenen Zahnpasten (Negativkontrolle: Wasser; Testpasten: Basis-Paste (B-P: Polyethylenglykol 32 (PEG-32), Sorbitol, Hydroxyethylzellulose, Siliziumdioxid (SiO₂), Titandioxid (TiO₂), Natrium-Laurylsulfat), Hydroxylapatit-Paste (HA-P: B-P, 8 % Hydroxylapatit, Aluminium-Lactat (Al-Lactat), Natrium-Fluorid (NaF) 1360 ppm), Abrasiv-Paste (A-P: B-P, RDA: 100, Al-Lactat, NaF 1360 ppm), Chlorhexidin-Paste (CHX-P: B-P, Chlorhexidin Digluconate 0.05 %, Al-Lactat, Aluminium-Fluorid (AlF) 1360 ppm), Kräuterextrakt-Paste (H-P: B-P, Petersilienöl, Curcuma Xanthorrhiza Wurzelextrakt, NaF 900 ppm)) auf die *in situ* Biofilmbildung zu testen wurden fünf Probanden für 24 h bovine Dentinprüfkörper (PK, n=120) mit einem geätzten und einem polierten Bereich im Oberkiefermolarenbereich mittels Miniplast-Schienen eingesetzt. Die PK im 1. Quadranten wurden nach 0,5 h, 12 h und 23,5 h für 30 s standardisiert geputzt, dabei kamen die in ihrer Position belassenen PK im 2. Quadranten lediglich mit dem Zahnpastaschaum-Speichel-Gemisch in Berührung.

Die Biofilmbedeckung der PK und die Vitalität der Bakterien im Biofilm wurden fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Zur morphologischen Charakterisierung der Biofilme wurden raster-elektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen angefertigt. Mit der energiedispersiven Röntgenspektroskopie (EDX) wurden Elementanalysen der Dentinoberfläche, des Biofilms und der Zahnpastabestandteile durchgeführt.

Ergebnisse: Die geringste Biofilmneubildung zeigten PK, die mit der HA-P und mit der CHX-P in Berührung kamen bzw. damit geputzt wurden. Die geputzten PK der HA-P zeigten im Vergleich zu der Versuchsreihe mit Wasser und der H-P signifikant weniger Biofilmbedeckung. Bei dem Vergleich mit der CHX-P, A-P und B-P konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Auf der ungeputzten Oberfläche zeigten die PK der HA-P eine quantitative Reduktion des Biofilms im Vergleich zu Wasser, H-P und A-P. Die ungeputzten PK, der CHX-P und A-P wiesen überwiegend avitale Bakterien im Biofilm auf. Auf den PK der B-P und HA-P

waren die Mengen vitaler und avitaler Bakterien im Biofilm vergleichbar. Die höchste Anzahl an vitalen Bakterien trat bei der Negativkontrolle mit Wasser auf. Bei den HA-P-Ansätzen wurden auf beiden Seiten (geputzt/ungeputzt) Zahnpastarückstände in den Dentintubuli gefunden, die in der EDX-Analyse als HA identifiziert wurden.

Schlussfolgerung: Die HA-P erwies sich in der vorliegenden Studie als Wirksam bei der Biofilmentfernung, sowie bei der Reduktion der Biofilmneubildung. Der HA-Eintrag in die Dentintubuli und die Wirkung der Zahnpastarückstände auf den Biofilm bedürfen weiteren Untersuchungen.

1.2 Abstract

Objectives: Hydroxylapatite (HA) is used in regular toothpastes as an abrasive cleaning particle. Currently, the question is being discussed, if HA nanoparticles are suitable for the remineralization of the tooth structure in the case of an initial caries diagnosis. The present study investigates the effect of HA on initial biofilm formation on dentine as well as the possible material entry in the dentinal tubules.

Materials and methods: To compare the influence of different toothpastes on biofilm formation *in situ* bovine dentine slabs (n=240) mounted on acrylic splints were worn by 5 volunteers in their upper jaws for 24 h. Specimens placed in the first quadrant were brushed after 0.5 h, 12 and 23.5 h for 30 s each time, specimens in the second quadrant were left unbrushed but contaminated with toothpastes slurries. Toothpastes included: basic paste (B-P: polyethylenglykol 32, sorbitol, hydroxyethylcellulose, silica, titanium dioxide, sodiumlauryl sulfate), additionally to ingredients of B-P the other toothpastes contained: herb paste (H-P: carum petroselinum seed oil, curcuma xanthorrhiza root extract, sodium fluoride 900 ppm), abrasive paste (A-P: RDA: 100, aluminum lactate, sodium fluoride 1360 ppm) chlorhexidine paste (CHX-P: chlorhexidine digluconate 0.05 %, aluminum lactate, aluminum fluoride 1360 ppm), hydroxyapatite paste (HA-P: hydroxyapatite, aluminum lactate, sodium fluoride 1360 ppm). Brushing with water (W) served as control. The biofilm coverage of the specimens and vitality of the bacteria were analyzed by fluorescence microscopy. To provide a morphological description of the biofilms, images were taken with a scanning-electron-microscope (SEM). Energy dispersive X-Ray spectroscopy (EDX) was used for the elemental analysis of the dentine surface, the biofilm and toothpaste components.

Results: The lowest biofilm amount was observed on specimens which came into contact with HA-P and CHX-P or which were brushed with these toothpastes respectively. The brushed specimens of HA-P showed significantly less biofilm coverage compared to the water and H-P series of experiments. Compared with the CHX-P, A-P. and B-P no significant differences were found.

On the unbrushed surface, the specimens of HA-P showed a quantitative reduction in biofilm compared to water, H-P and A-P. The unbrushed specimens of CHX-P and A-P showed mainly avital bacteria. On the specimens treated with B-P and HA-P the quantity of vital and avital bacteria was comparable. The highest number of vital bacteria occurred with the negative control by water. In the HA-P group both, brushed and unbrushed specimens, showed depositis of tooth paste in orifices of the dentinal tubules, which were identified as HA by the EDX-Analysis.

Conclusion: In the present study, HA-P proved to be effective in biofilm removal as well as in the reduction of biofilm formation. The HA presence in the dentinal tubules and the effect of tooth paste residues on the biofilm still require further research.

2 Einleitung

2.1 Literaturübersicht

2.1.1 Dentin

Dentin bildet den Hauptteil der Zahnhartsubstanz; es umgibt die Pulpa, determiniert die Zahnform und wird zur Mundhöhle vom Schmelz bedeckt. Durchzogen wird das Dentin von Dentinkanälchen (Tubuli), in denen Odontoblastenfortsätze verlaufen, die das Dentin physiologisch unterhalten [Nanci, 2008]. Die Dentintubuli reichen von der Pulpa bis an die Schmelz-Dentin-Grenze heran. Der Durchmesser der Kanälchen beträgt nahe der Schmelz-Dentin-Grenze $0,8 \mu\text{m}$ ($0,5 - 1,4 \mu\text{m}$) und in Pulpanähe $1,9 \mu\text{m}$ ($1,0 - 2,3 \mu\text{m}$). Auch die Anzahl der Dentintubuli variiert. In der Nähe der Pulpa werden im Durchschnitt $43.000/\text{mm}^2$ (range: $22.000 - 59.000 \text{mm}^2$) und nahe der Schmelz-Dentin-Grenze nur $20.000/\text{mm}^2$ (range: $7.000 - 40.000 \text{mm}^2$) Dentintubuli gefunden [Garberoglio und Brännström, 1976].

Das Dentin wird in mehrere Schichten unterteilt. Das Prädentin liegt als innerste Schicht der Pulpa an; die äußerste, dem Schmelz anliegende Schicht heißt Manteldentin [Hellwig et al., 2013]. Das Peritubulardentin umgibt die einzelnen Tubuli. Zwischen den Tubuli befindet sich ein Netzwerk aus kollagenen Fasern, das das intertubuläre Dentin stabilisiert [Marshall et al., 1997].

Im Gegensatz zum Schmelz ist Dentin ein lebendes Gewebe, das auf physiologische und pathologische Prozesse reagiert [Anand Sherwood und Lakshmi Narayanan, 2010]. Das Fehlen von zellulären Bestandteilen im Dentinkörper macht die Regeneration von zerstörtem Dentin jedoch unmöglich. Odontoblasten, die sich direkt an der Dentin-Pulpa-Grenze befinden, können neues Dentin bilden, das jedoch nur in diesem Grenzbereich abgelagert wird [Linde und Goldberg, 1993]. Durch in der Pulpa vorhandene Stammzellen ist die Bildung von Reizdentin möglich, das sich jedoch strukturell von regulär gebildetem Dentin unterscheidet.

Dentin setzt sich aus ca. 70 Gewichtsprozent (Gew.-%) anorganischen Anteilen (Calcium und Phosphat in Form von Hydroxylapatit (HA)), 20 Gew.-% organischen Anteilen (überwiegend Kollagen und kollagenartige Verbindungen) und 10 Gew.-% Wasser zusammen. Die anorganischen Anteile liegen wie im Schmelz in kristalliner Form vor, jedoch sind die Kristalle kleiner und dünner (Länge: 20 nm; Breite: 18 - 20 nm, Dicke: 3,5 nm). Dentin ist hochelastisch und verformbar; seine Permeabilität übersteigt die des Schmelzes [Hellwig et al., 2013].

Normalerweise wird das Dentin vom Schmelz und von der Gingiva bedeckt, jedoch kommt es im Laufe der Zeit durch Abnutzungsprozesse des Zahnschmelzes, wie Erosion, Attrition und

Abrasion, zu seiner Freilegung. Auch die beispielsweise durch inadäquate Mundhygiene, abrasive Zahnpasten und harte Zahnbürsten, akute und chronische parodontale Erkrankungen, Zahnfehlstellungen und kieferorthopädische Behandlungen entstehenden Gingivarezessionen führen zu freiliegendem Dentin. Thermische und chemische Reize am freiliegenden Dentin lösen Hypersensibilitäten aus. Die derzeitig geläufigste Theorie zur Erklärung der Hypersensibilität von Dentin ist das „Hydrodynamische Modell“ nach Brännström. Danach verursachen äußere Reize schnelle Flüssigkeitsbewegungen innerhalb der Dentintubuli, wodurch es zu Deformationen der Odontoblasten und der Nervenendigungen kommen kann, was die Schmerzempfindung auslöst [Brännström et al., 1967].

2.1.2 Biofilme

Von der Wissenschaft wurden Bakterien lange Zeit als solitär lebende Organismen betrachtet. Aktuell geht man jedoch davon aus, dass sie mehrheitlich in Biofilmen organisiert sind [Watnick und Kolter, 2000]. Biofilme (syn. Plaque) sind in einer Matrix aus polymeren Molekülen eingebettete Bakteriengemeinschaften [Costerton, 1994]. Zu den Voraussetzungen für die Entstehung von Biofilmen gehört das Vorhandensein einer Grenzfläche zwischen zwei Phasen (z.B. Wasser - Festkörper) sowie ein ausreichendes Nahrungsangebot [Costerton, 1987].

In einem Biofilm zu leben hat Vorteile für die Mikroorganismen, da sie im Vergleich zu einer planktonischen Lebensweise den Umgebungseinflüssen nicht ungeschützt ausgesetzt sind. In der Gemeinschaft können Substratmangel, Noxen (z.B. Antibiotika) oder auch extreme pH-Wert-Schwankungen besser toleriert werden [Watnick und Kolter, 2000, Mabrouk et al., 2010, Carlsson, 1997].

Biofilme zeigen einen charakteristischen Aufbau [Stoodley et al., 1998, Costerton, 1994]. Die Mikroorganismen sind in einer Matrix aus Wasser und extrazellulären polymeren Substanzen eingebettet. Innerhalb des Biofilms erstreckt sich ein Netzwerk aus Kanälchen, die den Austausch und den Transport von Nährstoffen, Ionen, Signalmolekülen und Stoffwechselprodukten ermöglichen [Stoodley et al., 1994, Nielsen und Molin, 2000]. Die Matrix stabilisiert den Biofilm und gestattet Wechselwirkungen, Interaktionen und gemeinsame Reaktionen der Bakterien. Zusätzlich kann ein Genaustausch zwischen den verschiedenen Bakterienpezies stattfinden. Im Biofilm koordinieren die Bakterien ihr Verhalten über *Quorum sensing*. Damit wird die Fähigkeit der Bakterien beschrieben, die Zelldichte indirekt über die Konzentration sogenannter Autoinducer messen zu können. Wenn die Zelldichte einen gewissen Schwellenwert überschreitet, hat das Auswirkung auf die Genexpression der einzelnen Zelle. Der Biofilm ist damit ein

leistungsfähiges Ökosystem, das auf seine Umwelt reagiert [Chalmers et al., 2008, Jayaraman und Wood, 2008, Kolenbrander et al., 2002].

Da Biofilme bevorzugt an Grenzflächen mit warmem und feuchtem Klima vorkommen, stellt die Mundhöhle ein attraktives Habitat dar. Durch die konstanten Umweltbedingungen und das regelmäßig eingebrachte Substrat (Nahrung) finden die Mikroorganismen hier gute Lebensbedingungen. Im Gegensatz zu anderen Geweben wird die Oberfläche der Zähne nicht durch Abschilferung und Regeneration ständig erneuert, was die Ausbildung von Biofilmen und das Überleben der Mikroorganismen erleichtert [Hannig und Hannig, 2007].

In Biofilmen leben in Abhängigkeit von der Lokalisation und damit von den Lebensbedingungen verschiedene Bakterien (grampositive / gramnegative Bakterien, fakultative Anaerobier / obligate Aerobier). In den Biofilmen in Zahnfissuren dominieren grampositive Bakterien und Streptokokken. Auch in den approximalen Plaque herrschen Streptokokken und grampositive Stäbchen wie Aktinomyzeten vor. Die gingivale Plaque enthält dagegen hauptsächlich obligate Anaerobier wie Fusobakterien und *Prevotella spec.* [Marsh und Bradshaw, 1995].

Pellikel- und Biofilmbildung

Durch Adsorption von Proteinen und Biomolekülen aus Speichel, Sulkussektret, Plasma- und Nahrungsbestandteilen entsteht die sogenannte Pellikel. Diese zunächst bakterienfreie Schicht aus Proteinen, Glykoproteinen, Plasmaproteinen, Kohlenhydraten, Lipiden und Enzymen ist ungefähr 0,1 - 1 μm dick [Hannig und Hannig, 2007, Hannig und Joiner, 2006, Hojo et al., 2009]. Voraussetzung für die Adsorption der Speichelproteine ist eine negativ geladene Schmelzoberfläche, die dadurch entsteht, dass die Calcium-Ionen des Schmelzes bei Kontakt mit dem Speichel eine größere Tendenz zeigen, in Lösung zu gehen, als die Phosphat-Ionen [Bennick et al., 1979, Moreno et al., 1982, Hay, 1973]. Als Pellikel-Präkursoren fungieren Phosphoproteine wie Statherin, Histatin und prolinreiche Proteine mit einer hohen Affinität zur Ionenschicht auf der Zahnoberfläche [Yao et al., 1999]. Neben den Pellikel-Präkursoren lagern sich in initialen Biofilmen auch Muzine, Glykoprotein I und II, Amylase, Cystatin, Lysozyme, Lactoferrin, Carbonanhydrase I und II, sowie Glykosyltransferasen ein. Es ist davon auszugehen, dass dabei nicht nur elektrostatische Anziehungskräfte eine Rolle spielen, sondern auch Van-der-Waalskräfte und hydrophobe Wechselwirkungen [Hannig und Joiner, 2006, Vassilakos et al., 1992, Vassilakos et al., 1993].

Die initiale Pellikelbildung dauert nur wenige Minuten. Die deutlich langsamere Reifung der Pellikelschicht ist durch eine kontinuierliche Adsorption von weiteren Biomolekülen aus dem Speichel gekennzeichnet. Nach ca. 30 - 90 min erreicht die Pellikeldicke mit 100 - 1000 nm ein

Plateau. Bei der Anheftung weiterer Biomoleküle spielen auch Wechselwirkungen zwischen Proteinen (Protein-Protein-Interaktion) eine Rolle. Die beiden Phasen lassen sich im Rasterelektronenmikroskop (REM) gut unterscheiden: Die erste initiale Phase liegt dem Schmelz direkt auf und ist elektronendicht. Die reife Pellikel ist dagegen eine globuläre Schicht mit einer geringeren Elektronendichte [Hannig, 1999, Hannig und Joiner, 2006].

Die komplexen Funktionen der Pellikel sind für physiologische und pathologische Prozesse relevant. Als Schmiermittel oder Schutzfilm schützt sie die Zahnoberfläche beim Kauen gegen Reibungskräfte [Aguirre et al., 1989, Tabak et al., 1982]. Als semipermeable Schicht reguliert sie die De- und Remineralisationsprozesse des Schmelzes über den Austausch von Calcium und Phosphat [Zahradnik et al., 1976, Zahradnik et al., 1977, Zahradnik et al., 1978]. Zusätzlich reduziert die Pellikel den säurebedingten Verlust von Mineralstoffen, wobei auch die Lipidkomponenten der Pellikel eine Rolle spielen [Nekrashevych und Stösser, 2003]. Durch Speichelkomponenten wie Immunglobulin A (IgA), Lysozym, Lactoferrin, Cystatin und Histatin besitzt die Pellikel antibakterielle Eigenschaften. Pathophysiologisch bedeutsam ist die Pellikel als Adhäsionssubstrat für Bakterien. Daher spielt sie eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Karies und Parodontopathien [Ørstavik und Kraus, 1973, Hannig et al., 2005, Hannig und Joiner, 2006].

Da Proteine und Biomoleküle schneller über Van-der-Waals-Kräfte mit der Zahnoberfläche in Kontakt treten können als Bakterien [Gristina et al., 1988] geschieht die bakterielle Besiedlung immer erst sekundär. Die ersten Bakterien (Pionierkeime) wie *Streptococcus (S.) oralis*, *S. sanguis* und *S. mitis* binden zunächst reversibel über physikochemische Kräfte (Van-der-Waals-Kräfte) und hydrophobe Kräfte an die Pellikel. Dieser Prozess ist die Grundlage für die irreversible bakterielle Adhärenz über stereochemische Kräfte [Hannig und Hannig, 2007, Hannig und Joiner, 2006, Hojo et al., 2009]. Die initiale reversible Bindung erfolgt über Fimbrien auf der Oberfläche von Bakterien. Später wird der Kontakt über Adhäsine in der Bakterienwand (rezeptorvermittelte Adhärenz) gefestigt.

Nach der ersten initialen Besiedlung folgt die Ausreifung des oralen Biofilms durch Koaggregation (Bindung unterschiedlicher Bakterienspezies) und Koadhäsion (Bindung derselben Bakterienspezies) von weiteren Bakterien an die Pionierkeime [Marsh und Bradshaw, 1995]. Am Plaquewachstum sind gramnegative Bakterien wie *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* und *Capnocytophaga spec.* beteiligt. Da *Fusobacterium nucleatum* mit allen oralen Mikroorganismen koaggregieren kann, besitzt diese Spezies große Bedeutung für das Wachstum des Biofilms [Kolenbrander, 2000, Stickler, 1999].

Innerhalb der ersten 24 h ist das Wachstum des Biofilms durch eine kontinuierliche Adsorption von Mikroorganismen, sowie deren Proliferation gekennzeichnet. Durch die Synthese und Sekretion von extrazellulären Polysacchariden (EPS) wird die charakteristische extrazelluläre Matrix des Biofilms gebildet [Rupf et al., 2012, Marsh und Bradshaw, 1995]. Nach ca. 1 Woche siedeln sich zusätzlich *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* und Spirochäten im Biofilm an. Nach ungefähr 10 - 14 Tagen ist die Plaque voll ausgereift. Aufgrund der unterschiedlichen Lebensbedingungen (z.B. Sauerstoffangebot) entstehen in verschiedenen Bereichen des Biofilms unterschiedliche Lebensgemeinschaften. Die Bakterien im Biofilm besitzen weiterhin die Fähigkeit, sich aus dem Biofilm zu lösen und in die planktonische Phase überzugehen [Marsh und Martin, 2003]. Durch Erosion und Abschilferung nach Ausreifung des Biofilms werden Tochterkolonien freigesetzt. Somit können Bakterien auch im Schutz der Biofilmgemeinschaft neue Oberflächen besiedeln [Folwaczny und Hickel, 2003].

Zur Übersicht werden hier die Schritte der Biofilmbildung noch einmal zusammengefasst [Marsh und Bradshaw, 1995]:

1. Pellikelbildung (acquired pellicle)
2. Unspezifische reversible physikochemische Wechselwirkung zwischen Speichelbakterien und der Pellikelschicht
3. Spezifische stereochemische Wechselwirkung zwischen den primären Bakterien und den Rezeptormolekülen der Pellikelschicht
4. Koaggregation/Koadhäsion
5. Entwicklung von horizontalen und vertikalen Schichten innerhalb des Biofilms
6. Absiedelungen aus dem reifen Biofilm

2.1.3 Biofilmmangement/Beeinflussung des Biofilms

Biofilme auf der Zahnoberfläche gelten als wichtigste Ursache für die Entstehung von Karies [Moore und Moore, 1994, Marsh, 2005]. Somit stellt die Verhinderung von Biofilmsammlungen an Zähnen und Gingiva eine der wichtigsten Maßnahmen zur Gesunderhaltung des oralen Hart- und Weichgewebes dar [Baehni und Takeuchi, 2003, Longbottom et al., 2009].

Die mechanische Reinigung der Zahnflächen durch die Zahnbürste, die Anwendung von Zahnseide und Interdentalbürstchen sind effektive Mittel zur Entfernung von Biofilmen. Nach einer adäquaten Reinigung bleibt lediglich ein ungeordneter Biofilm als dünne Schicht zurück [Kolahli und Soolari, 2006, Van Der Weijden und Slot, 2011].

Zahlreiche Studien belegen, dass die Pellikelformation und -zusammensetzung von den individuellen Nahrungsgewohnheiten abhängt [Rykke und Sönju, 1991]. Nachgewiesen wurde beispielsweise, dass der Konsum von Milch mit Saccharose, Sorbitol oder Xylitol die Zusammensetzung der Speichelpellikel verändert [Smith und Bowen, 2000]. Milchproteine und Casein können von der Zahnoberfläche adsorbiert werden und im Austausch mit Albumin in die Pellikel eingebaut werden [Schübach et al., 1996].

Zahnpasta

Eine Zahnpasta ist eine Suspension oder ein Gel, das zusammen mit einer Zahnbürste zur Aufrechterhaltung der Gesundheit und der Ästhetik der Zähne verwendet wird [Lippert, 2013]. Studien belegen, dass die Zahnreinigung mit einer handelsüblichen Zahnpasta die Dicke und Quantität der Pellikel signifikant reduziert [Hannig und Joiner, 2006]. Das Zähneputzen sorgt dafür, dass die Zahnoberfläche mechanisch von Nahrungsrückständen und Biofilmen befreit wird. Zudem enthält die Zahnpasta auch kariostatische Wirkstoffe [Tenuta und Cury, 2013].

Mittel zur Reinigung der Zähne existierten schon in frühen Kulturen. Hauptbestandteil des damals verwendeten Zahnpulvers waren Eierschalen und Asche. Seitdem hat sich die Zusammensetzung stark verändert. Heute bestehen Zahnpasten aus komplexen Rezepturen mit über 20 Inhaltsstoffen. Dabei werden immer neue Zahnpasten entwickelt, die speziell auf die jeweiligen Bedürfnisse des Individuums ausgerichtet sind. Aktuell sind Zahnpasten auf dem Markt, die gegen Karies vorbeugen, Parodontitis und Zahnfleischprobleme behandeln, Halitosis und Zahnstein reduzieren, Erosionen und Dentinhypermensibilitäten bekämpfen oder Zähne aufhellen.

Durch die Vermischung der Zahnpasta mit dem Speichel während des Zähneputzens werden die Wirkstoffe verdünnt und verteilt. Zusätzlich ändert die Beimengung des Speichels die Temperatur und den pH-Wert des Gemisches, wodurch die Pufferkapazität gesteigert wird. Dies ist eine

Voraussetzung dafür, dass Speichelkomponenten wie Calcium und Proteine mit Bestandteilen der Zahnpasta reagieren [Lippert, 2013].

Mittlerweile gehören Zahnpasten zu den komplexesten Gesundheitsprodukten, die auf dem Markt vertreten sind. Wirkstoffe, Tenside, Geschmacks- und Farbstoffe, sowie Konservierungsmittel und andere Hilfsstoffe sind in einer Matrix aus Hydrokolloiden und Wasser eingebettet [Lippert, 2013]. Die aktuell verwendeten Wirkstoffe zielen darauf ab, die Biofilmbildung zu reduzieren ohne das biologische Gleichgewicht der Mundflora zu stören [Brex, 1997]. In den vergangenen Jahren wurde bei der Herstellung von Zahnpasten und Mundspüllösungen darauf geachtet, Wirkstoffe zu verwenden, die die Fähigkeit besitzen, über einen längeren Zeitraum am Wirkort zu verbleiben. Diese Eigenschaft wird als Substantivität bezeichnet [Brex et al., 2003, Brex, 1997].

Hydroxylapatit (HA)

HA ist ein Mineral, das im hexagonalen Kristallsystem kristallisiert und dessen chemische Formel $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \cdot 2(\text{OH})$ ist [Pepla et al., 2014]. Mit 80 - 90 % ist HA der Hauptbestandteil des Zahnschmelzes und für dessen weißes Erscheinungsbild verantwortlich. Organisiert in Prismen haben die HA-Kristalle im Zahnschmelz eine Länge von ca. 100 - 1000 nm, eine Breite von ca. 68 nm und eine Dicke von ca. 26 nm. Umgeben sind diese Kristalle von einer Hydratationsschale sowie von kleineren Mengen an organischen Materials (Proteine, Lipide und Kohlenhydrate). Im Gegensatz zum Schmelz sind die HA-Kristalle im Dentin überwiegend in einer organischen Matrix, aus größtenteils Typ I Kollagen, eingelagert und mit einer Länge von 50 nm, einer Breite von 25 nm und einer Dicke von ca. 2 - 5 nm kleiner als die Kristalle im Zahnschmelz [Bertassoni et al., 2009]. Neben den physiologischen Prozessen wie Abrasion, Attrition und Erosion können auch pathologische Geschehnisse zum Verlust der Zahnhartsubstanz und somit zur Zerstörung von HA-Kristallen führen [Ganss, 2014].

In unterschiedlicher Partikelgröße werden HA-Kristalle heute in Zahnpasten als Putzkörper eingesetzt, um Verfärbungen zu beseitigen [Lippert, 2013]. Als Nanopartikel wirkt HA abrasiv auf die Zahnhartsubstanz und kann im Gegensatz zu Siliziumoxid oder Kunststoffen biologisch abgebaut werden [Kodaka et al., 1999]. *In vitro* Untersuchungen unter erosiven Bedingungen zeigen, dass sich die Abrasionswerte je nach Zahnpastaformulierung unterscheiden [Arnold et al., 2016].

Als Nanopartikel (Durchmesser: 0,1 - 100 nm) sollen sie die Remineralisation der Zahnhartsubstanz fördern und Karies vorbeugen [Kim et al., 2006]. In *in vitro* Studien erwies sich eine Konzentration von 10 % Nano-HA-Kristalle als optimal für die Remineralisation von Initialläsionen [Huang et al., 2009, Klimek et al., 2010]. In einer weiteren *in vitro* Studie wird suggeriert,

dass Zahnpasten mit Nano-HA eine bessere Remineralisation als vergleichbare Zahnpasten mit Amino-Fluorid bewirken [Tschoppe et al., 2011]. Dies ist jedoch als sehr kritisch zu betrachten da eine weitere Studie diese Ergebnisse relativierte. Eine HA beinhaltende Zahnpaste konnte bei dieser *in vitro* Untersuchung den Substanzverlust nicht im vergleichbaren Umfang als eine fluoridhaltige Zahnpasta minimieren [Esteves-Oliveira et al., 2017]. Möglicherweise stellen daher Zahnpasten mit HA eine Ergänzung zu Fluorid-haltigen Zahnpasten dar [Najibfard et al., 2011]. Als zusätzlicher Wirkstoff in Glasionomer-Zement soll HA zur Remineralisation der geschädigten Zahnhartsubstanz beitragen [Moshaverinia et al., 2008].

Außerdem wird HA in der Parodontal- und Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie als Knochenersatzmaterial benutzt, da es sich mit dem Knochen verbindet, ohne toxisch oder entzündlich auf das Gewebe zu wirken. Außerdem induziert HA die Knochenneubildung über eine Aktivierung der Osteoblasten und wirkt somit osteoinduktiv [Pepla et al., 2014].

Außerdem soll die Verwendung von Nano-HA-Partikel in Zahnpasten die Dentinüberempfindlichkeit nach Benutzung von Weißmacher-Zahncremes reduzieren [Browning et al., 2012]. Weitere aktuelle *in vitro* und *in situ* Studien zur Verminderung von Dentinhypersensibilität konnten die Wirkung von nanokristallinen HA zum Verschluss offener Dentintubuli zeigen. Untersucht wurden hierbei in einem *in situ* Putzmodell 10 - 15 Gew.-% nanokristallines HA und NovaMin und in einer *in vitro* Studie fluoridhaltige und HA-haltige Zahnpasta [Amaechi et al., 2015, Farooq et al., 2015]. Bei einer klinischen Studie die eine Verminderung der Dentinhypersensibilität untersuchte war die HA-haltige Zahnpasta vergleichbar effektiv als eine 8 % Arginin-haltige Zahncreme und effektiver als eine 5 % NovaMin enthaltende Paste [Jena und Shashirekha, 2015].

Die Nano-HA-Kristalle gleichen in ihrer Struktur und Morphologie den abgeschilferten natürlichen Schmelzkristallen und gehören somit zu den bioverträglichsten Materialien. In der Medizin werden sie schon seit Jahrzehnten eingesetzt [Hannig und Hannig, 2010a]. Zum ersten Mal wurden Nano-HA-Kristalle 1970 von der National Aeronautic and Space Administration (NASA) verwendet, als bei Astronauten, die sich lange Zeit in der Schwerelosigkeit aufhielten, ein hoher Mineralverlust an den Zähnen beobachtet wurde. Die Sangi Co. Ltd entwickelte daraufhin zunächst ein synthetisches HA, um den Mineralverlust auszugleichen, und acht Jahre später eine Zahnpasta mit Nano-HA-Kristallen. 2006 kam dann die erste Zahnpasta mit synthetisch hergestelltem HA auf den europäischen Markt. Bei der Vermarktung wird suggeriert, dass HA-Pasten eine Remineralisation und Reparatur des Zahnschmelzes bewirken. Das HA soll sich als eine schützende Schicht aus synthetischem Schmelz auf die Zahnoberfläche legen [Pepla et al., 2014].

Chlorhexidin (CHX)

CHX ist ein Antiseptikum, das in Form von Gelen, Spüllösungen oder als Zusatzstoff in Zahnpasten in der Zahnmedizin Anwendung findet. Derzeit gilt es als Goldstandard der antibakteriellen Therapie [van Rijkom et al., 1996]. Aufgrund seiner pharmakologischen Eigenschaften wird CHX zur Bekämpfung von Plaque, Gingivitiden und zur Biofilmreduktion eingesetzt [Harald und Schiøtt, 1970, Harald et al., 1972]. Seit den 1970er Jahren wird CHX-Digluconat in einer Konzentration von 0,06 - 2 % in der Zahnheilkunde verwendet [Harald und Schiøtt, 1970, Komorowski et al., 2000]. Studien zeigen, dass Zahnpasten mit 1 % oder 0,4 % CHX in Kombination mit Zink das Plaquewachstum und Zahnfleischentzündungen signifikant hemmen [Yates et al., 1993, Sanz et al., 1994].

Als Biguanid lagert sich CHX in die bakterielle Zellmembran ein und zerstört sie dadurch. CHX wirkt somit bakterizid und bakteriostatisch gegen viele grampositive und gramnegative, fakultativ anaerobe und aerobe Bakterien [Lin et al., 2003]. Beispielsweise ist *S. mutans* anfälliger gegenüber CHX als *S. aureus* [Emilson, 1994]. Außerdem kann CHX auch in der antimykotischen Therapie eingesetzt werden [Barkvoll und Attramadal, 1989]. Mit einer Substantivität von bis zu 24 h sorgt es im Mund über einen längeren Zeitraum für ein bakteriostatisches und plaquehemmendes Milieu. Die hohe Substantivität beruht darauf, dass CHX als Diglukonsalz sehr gut löslich ist und durch seine niedrige Oberflächenspannung gut an der oralen Mukosa und an Zahnoberflächen haftet. Außerdem heften sich die kationischen CHX-Moleküle an die anionischen Phosphatgruppen der Bakterienmembran, wodurch die orale Verweildauer zusätzlich verlängert wird [Gjeramo et al., 1974, Davies, 1973].

Aufgrund seiner hydrophilen und hydrophoben Eigenschaften kann CHX sowohl an extrazelluläre Komplexe als auch an negative geladene Zellmembranen binden [Harald und Schiøtt, 1970]. Durch die Bindung an die Zellmembran der Bakterien wird das osmotische Gleichgewicht gestört und niedermolekulare Stoffe verlassen die Zelle [Komorowski et al., 2000]. Zudem denaturieren zytoplasmatische Proteine [Forsten und Karjalainen, 1977]. Aufgrund seines kationischen Charakters ist die Verwendung von CHX in Zahnpasten schwierig, da das Risiko einer Inaktivierung durch anionische Inhaltsstoffe besteht [Sanz et al., 2013].

Neben seiner antimikrobiellen und antiseptischen Wirkung zeigt CHX zudem Nebenwirkungen, die bei jedem Einsatz abgewogen werden müssen. Dazu zählen Geschmacksirritationen [Flötra et al., 1971], Schleimhautablösungen [Emilson, 1994] und Verfärbungen an Zähnen [Hannig und Joiner, 2006, Heyden, 1973] und Zunge [Jenkins et al., 1994]. Eine mögliche Resistenzbildung der Bakterien nach intensivem Gebrauch von CHX wird kontrovers diskutiert, scheint jedoch durch Veränderungen der Zellmembranstrukturen und Zelloberflächen denkbar. In einem *in vitro* Experiment wurde eine Abnahme der Sensitivität von *S. mutans* gegenüber CHX beobachtet [Järvinen et al., 1995].

Aluminium-(Al)-Lactat

Das zu den Gerbstoffen gehörende Al-Lactat ist ein Salz der Milchsäure. Es verfügt über adstringierende, schwach hämostatische und Protein-koagulierende Wirkungen [Fiedler, 1967].

Sein adstringierender Effekt beruht auf der Fähigkeit zur Präzipitation von Proteinen. Durch sein amphoterer Verhalten kann Al-Hydroxid sowohl mit Basen (Bildung von Aluminaten) als auch mit Säuren (Bildung von Al-Salzen) reagieren. Durch die Präzipitation von Proteinen können adstringierende Substanzen die aufgelockerte, entzündete Schleimhaut wieder straffen und deren Widerstandsfähigkeit gegenüber Bakterien erhöhen. Beispielsweise bildet sich das häufig mit einer Parodontitis vergesellschaftete, marginale Ödem durch die Einwirkung hyperosmolarer Salzlösungen zurück. Durch die osmotische Wirkung der Mineralmischung einiger Zahnpasten (meist mit Natriumchlorid (Na-Chlorid)) wird dem Gewebe Flüssigkeit entzogen und die Speichelsekretion angeregt, was sich positiv auf das Gewebe und die Mundreinigung auswirkt [Buddecke, 1981]. In einer Konzentration von 0,5 % wirkt Al-Lactat ca. 3 - 4 h adstringierend auf das Gewebe [Rathe et al., 2007, Wannemacher, 1964].

Möglicherweise schützt die Koagulationsmembran, die nach der Proteinkoagulation auf der Oberfläche gebildet wird, das Zahnfleisch kurzfristig vor Irritationen [Fiedler, 1967, Goodman und Gilman, 1955]. Al-Fluorid hat denselben Fluoridgehalt wie gewöhnliches Na-Fluorid und vereinigt somit antimikrobielle sowie kariostatische Effekte [Meyer-Lueckel et al., 2015].

Al-Lactat wird als Wirkstoff zur Behandlung von Entzündungen im Mund- und Rachenbereich eingesetzt und dient in der Dermatologie als Antihidrotikum. Die gesundheitlichen Auswirkungen von Al in Deodorants und Zahnpasten werden derzeit kontrovers diskutiert. In einer Studie wurde eine Al-Exposition als Risikofaktor für die Entwicklung von Alzheimer identifiziert [Rondeau et al., 2009]. Das Bundesinstitut für Risikobewertung gibt in Anlehnung an die europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (European Food Safety Authority) einen Grenzwert von 1 mg Al pro Woche pro Kilogramm Körpergewicht an [European Food Safety Authority, 2008].

Fluoride

Die Entstehung von Karies beruht auf einem Ungleichgewicht zwischen der De- und Remineralisation der Zahnhartsubstanz. Überwiegt die Demineralisation, entsteht durch Herauslösung von Schmelzanteilen aus dem Verbund eine Kavität. Das beschriebene Gleichgewicht kann durch Fluorid-, Calcium- und Phosphat-Ionen zu Gunsten der Remineralisation beeinflusst werden [Amaechi und van Loveren, 2013]. Beim Zähneputzen mit einer Fluorid-haltigen Zahnpasta diffundieren die Fluorid-Ionen in die Mukosa, den Speichel, die eventuell vorhandene Pellikel-

schicht und in die Zähne und sorgen so für ein Fluorid-Reservoir in der Mundhöhle. Beim Zähneputzen mit Fluorid-haltigen Zahnpasten kommt es daher nicht nur zu einem mechanischen Plaqueabrieb, sondern auch zu einer erhöhten Verfügbarkeit von Fluorid-Ionen in der Mundhöhle [Duckworth, 2013, Tenuta und Cury, 2013].

Die erhöhte Säureproduktion der Plaque senkt den pH-Wert, weil die Calcium- und Phosphat-Ionenkonzentrationen in der Plaqueflüssigkeit nicht ausreichen den Gleichgewichtszustand zu erhalten. Fluoridapatit und Fluorapatit bleiben auch bei niedrigen pH-Werten bis 4,7 stabil. Aufgrund seines niedrigen Löslichkeitsproduktes wird Fluoridapatit auch im leicht sauren pH-Wert schneller wieder gebildet als die Calciumphosphat-Phasen des Schmelzes. Somit beschleunigt Fluoridapatit die Remineralisation des Zahnes [Amaechi und van Loveren, 2013].

Gelöste Fluoride, die durch Zahnpasten oder Spüllösungen zugeführt werden, hemmen die Demineralisation effektiver als inkorporiertes Fluorid in der Zahnhartsubstanz. Dies zeigt eine Studie, in der menschlicher Zahnschmelz und Schmelz von einem Haifischzahn verglichen werden. Haifische haben einen weitaus höheren Anteil an Fluoridapatit in ihrem Schmelz als Menschen. Dennoch wiesen beide Spezies kariöse Läsionen auf. Wenn die Probanden eine 0,2 %ige Na-Fluorid-Lösung verwendeten, zeigte ihr Zahnschmelz weniger Mineralverluste als der Haifischschmelz [Øgaard et al., 1988].

Für die Kariesprävention spielt auch Calciumfluorid, bzw. das Calciumfluorid-ähnliche Präzipitat eine wichtige Rolle. Das Präzipitat schlägt sich nach Anwendung von Fluorid-haltigen Präparaten als Niederschlag auf der Zahnoberfläche nieder. Das Calcium stammt vermutlich aus dem Speichel und den Zähnen [Larsen und Richards, 2001]. Allerdings tritt Calciumfluorid in größeren Mengen nur bei Initialläsionen auf. Bei *in vitro* Untersuchungen an unversehrten Schmelzoberflächen konnten nur geringe Mengen detektiert werden [Hellwig et al., 1987].

Der Nachweis der antimikrobiellen Wirkung von Fluorid beruht überwiegend lediglich auf *in vitro* Studien. Beispielsweise wurde gezeigt, dass Fluorid den Kohlenhydrat-Metabolismus von oralen Streptokokken und Laktobazillen hemmt [Balzar Ekenbäck et al., 2001].

Um in die De- und Remineralisationsprozesse eingreifen zu können, muss Fluor als Fluorid-Ion vorliegen. Daher wird der Zahnpasta Na-Fluorid, Zinnfluorid oder Aminofluorid zusetzt [Pearce und Dibdin, 1995]. Durch eine Erhöhung der Zahnputzfrequenz lässt sich die Wirkung von Fluorid-haltigen Zahnpasten steigern [Marinho et al., 2003].

In einer Studie zeigten kariesinaktive Kinder bei der Benutzung von Zahnpasten mit unterschiedlichem Fluorid-Gehalt (500 ppm, 1100 ppm) keine signifikanten klinischen Unterschiede. Dagegen erwies sich der kariostatische Effekt der Zahnpasta mit 500 ppm Fluorid bei Kindern mit einem erhöhten Kariesrisiko als signifikant geringer [Lima et al., 2008].

Um eine Fluorose durch eine erhöhte Fluorid-Zufuhr bei Kindern zu verhindern wurden Grenzwerte festgelegt. Danach sollen Kinder ab dem Durchbruch der ersten Zähne einmal am Tag einen dünnen Film einer Fluorid-haltigen Zahnpasta (500 ppm) benutzen. Im Alter von 2 - 5 Jahren dürfen sie zweimal am Tag eine erbsengroße Menge verwenden. Nach Durchbruch der ersten bleibenden Zähne sollten sie auf eine Erwachsenenzahnpasta mit 1000 ppm umsteigen. Insgesamt wird eine maximale Fluoridaufnahme von 0,05 mg/kg Körpergewicht empfohlen [European Food Safety Authority, 2013].

Putzkörper

Kleine anorganische Partikel in Zahnpasten werden als Putzkörper bezeichnet. Sie dienen, zusammen mit der Zahnbürste der mechanischen Reinigung der Zähne. Die am häufigsten verwendeten Putzkörper sind Al-Oxidtrihydrat, Al-Oxid, Calcium-Hydrogenphosphatdihydrat, Calcium-Pyrophosphat, Siliziumdioxid und unlösliche Metaphosphate. Die Anzahl und die physikalischen Eigenschaften der verwendeten Putzkörper wirken sich auf die Reinigungsleistung der Zahnpasta und auf den Abrieb der Zahnhartsubstanz aus. Konventionelle Weißmacher-Zahnpasten enthalten mehr abrasive Putzkörper als die herkömmlichen Pasten oder Gele [Zantner und Kielbassa, 2002]. Der Abrieb der Zahnhartsubstanz durch die Zahnpasta wird international über den Radioactive-Dentin-Abrasion-(RDA)-Wert bestimmt. Mit dem Verfahren wird der abtragende Effekt eines Stoffes beim Dentin bestimmt. Durch eine Bestrahlung von extrahierten Zähnen mit Neutronen bildet sich in den äußersten Schichten radioaktiver Phosphor. Anschließend werden die extrahierten Zähne maschinell gebürstet und der Anteil des radioaktiven Phosphors (RDA-Wert) in der Putzlösung bestimmt. Die RDA-Werte werden wie folgt eingeteilt: 151 - 250 hohe, 70 - 150 mittlere, < 70 niedrige Abrasivität [Giles et al., 2009]. Da der RDA-Wert in einem *in vitro* Verfahren bestimmt wird, ist er nur bedingt auf die *in vivo* Situation übertragbar [Stokey et al., 1982]. Das Ausmaß des Abriebs beim Zähneputzen wird nicht nur durch den RDA-Wert der Zahnpasten, sondern auch durch individuelle Putzgewohnheiten und Techniken sowie durch die verwendeten Zahnbürsten bestimmt [González-Cabezas et al., 2013]. Zähneputzen ohne Zahnpasta zeigt keine signifikanten Abnutzungserscheinungen am Zahnschmelz [Absi et al., 1992, Sangnes, 1976].

2.2 Ziel der Arbeit / Fragestellung

Als Calcium- und Phosphat-Lieferant ist HA ein wichtiger Wirkstoff in der Zahnheilkunde. In Form von Nanopartikeln wird HA Zahnpasten zugesetzt, um die Remineralisation von Zahnschmelz und Dentin zu fördern [Lelli et al., 2014], kleinere Initialläsionen zu reparieren und vor einer weiteren Demineralisation der Zahnhartsubstanzen zu schützen [Li et al., 2008]. Laut vereinzelter Studien soll HA einen höheren remineralisierenden Effekt als die häufig in Zahnpasten verwendeten Fluoride besitzen [Tschoppe et al., 2011].

Ziel dieser *in vivo* Studie war die Analyse der initialen Biofilmneubildung auf Dentin unter dem Einfluss HA-haltiger Zahnpasten im Vergleich zu Pasten die CHX, Al-Ionen oder Fluorid enthielten. Weiterhin wurden die Dentintubuli auf einen möglichen Materialeintrag untersucht.

3 Material und Methode

3.1 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau ist zusammenfassend in Abbildung 1 dargestellt.

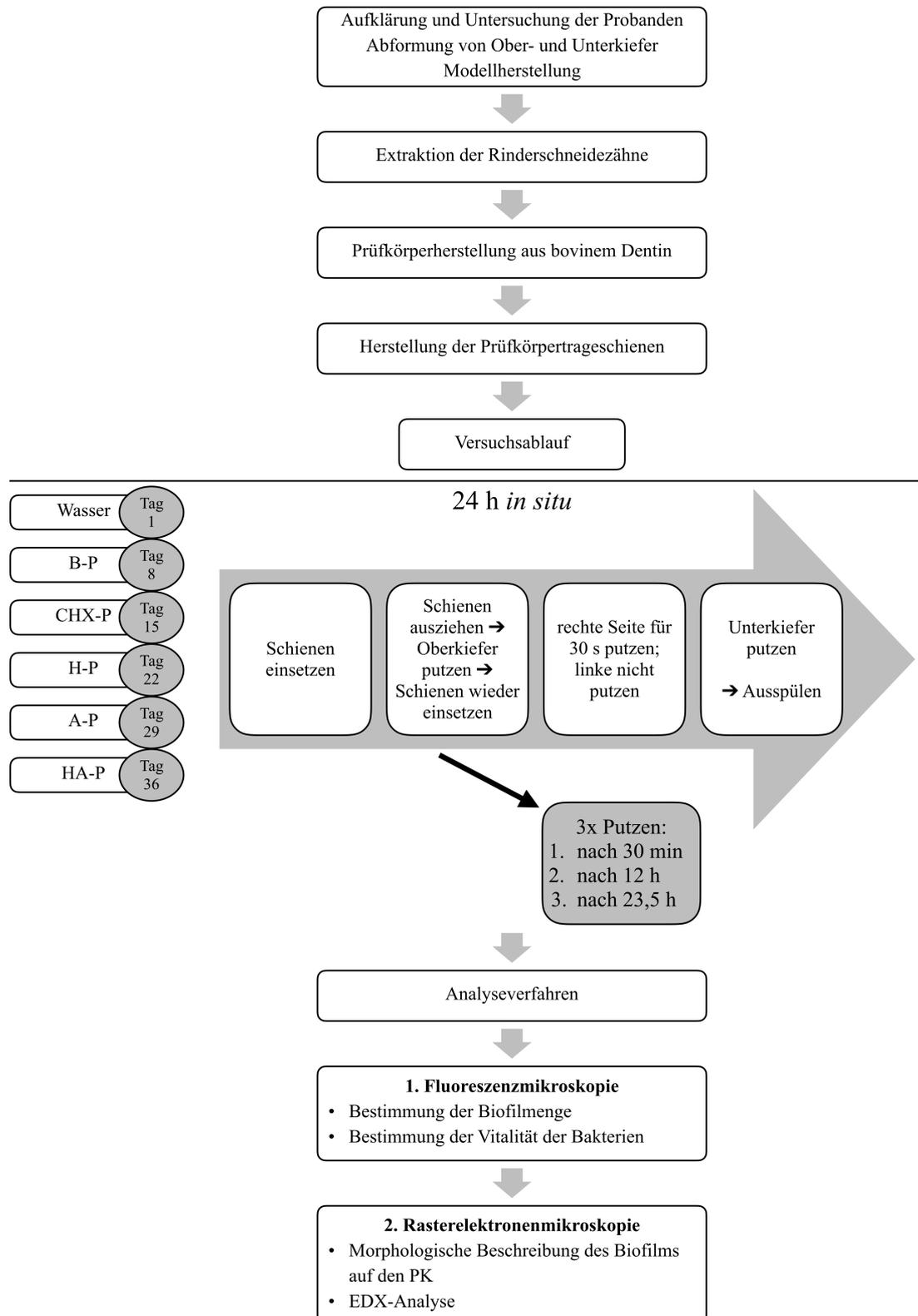


Abbildung 1: Überblick über den Versuchsaufbau der Studie.

3.2 Studiendesign

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine Pilotstudie mit fünf Probanden. Das Studiendesign wurde von der Ethikkommission unter der Kennung E 238/03 der Ärztekammer Saarland mit der Erweiterung am 22.07.2013 genehmigt.

3.2.1 Probanden

Fünf gesunde Probanden im Alter zwischen 24 und 45 Jahren nahmen an der Studie teil. Die Teilnehmer waren Mitarbeiter und Studenten der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde der Universitätsklinik in Homburg. Vor Studienbeginn wurden die Probanden auf Karies, Anzeichen für eine Parodontitis und verminderte/vermehrte Speichelflussrate untersucht. Alle Teilnehmer hatten einen physiologischen Speichelfluss, ein vollbezahntes Gebiss, suffiziente Füllungen, unauffällige Sulkusblutungs- und Gingivaindizes, keine Zahnfleischtaschen mit einer Tiefe > 3 mm und keine kariösen Läsionen. Keiner der Probanden rauchte, trank übermäßig Alkohol oder hatte spezielle Ernährungsgewohnheiten. Eine Einnahme von Antibiotika innerhalb der letzten sechs Monate konnte bei allen Probanden ausgeschlossen werden. Nach der Feststellung der Zahngesundheit wurden die Probanden über die Studie, sowie die Tragedauer und das Putzprotokoll aufgeklärt. Der Konsum von Alkohol, Zigaretten und die Verwendung von Mundspüllösungen jeglicher Art war während der gesamten Testphase den Probanden untersagt.

3.2.2 Prüfkörper-(PK)- und Schienenherstellung

Dentin-PK-Herstellung

Zur Gewinnung der Dentin-PK (n=120) wurden im Schlachthof Zweibrücken unversehrte Schneidezähne von zwei Jahre alten Rindern extrahiert. Die Zähne wurden bei 4°C in 0,1 %iger Thymol-Lösung (Apotheke des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg/Saar, Deutschland) gelagert. Eine Erkrankung der Tiere mit Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) konnte ausgeschlossen werden. Die Tiere wurden auf BSE getestet, da sie zum Verzehr weiterverarbeitet wurden. Die Zahnkrone der Schneidezähne wurde im Labor an der Schmelz-Zement-Grenze mit einer Diamantscheibe (Schleiftrennmaschine WOCO 50p, Conrad GmbH, Clausthal, Deutschland) unter Wasserkühlung abgetrennt (s. Abb. 2). Danach wurde die labiale Fläche von der oralen Fläche getrennt. Mit Hilfe eines Nassschleifgerätes (Gripo 2 V, Metkon Instruments Ltd, Bursa, Türkei) wurden aus der Labialfläche die Dentin-PK mit den Maßen 4 - 5 mm x 4 - 5 mm x 1 - 1,5 mm herausgeschnitten.

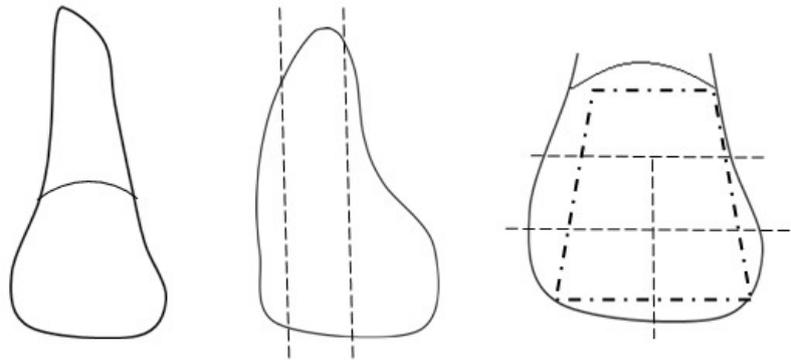


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Sägeschnitte zur Prüfkörpergewinnung.

Zur Freilegung der gesamten Dentinoberfläche wurden die Schmelzreste mit einer Schleifmaschine (Buehler, Düsseldorf, Deutschland) und Silikonkarborund-Schleifpapier (P600 - P4000, FEPA-P wasserfestes Silikonkarborund-Papier, Buehler, Düsseldorf, Deutschland) unter ständiger Wasserkühlung entfernt und die PK-Flächen zueinander parallelisiert. Zur Polierung und Standardisierung wurde Silikonkarborund-Schleifpapier in ansteigender Körnung (bis zu P4000) verwendet. Die Dentin-PK wurden anschließend mit einem Auflichtmikroskop (Zoom-Stereomikroskope SMZ 14, Motic GmbH, Wetzlar, Deutschland) bei 12-facher Vergrößerung kontrolliert.

Die polierten Dentin-PK wurden zur Entfernung von Polierresten für 30 s in einer Na-Hypochlorid-Lösung (Hedinger, Stuttgart, Deutschland) gelagert. Danach wurden sie fünfmal in destilliertem Wasser (Aqua dest., Ecotainer, 1000 ml, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) gewaschen. Nach gründlicher Spülung wurden die Dentin-PK im Ultraschallbad (Sonorex RK 100H, Bandelin, Berlin, Deutschland) für 2 min gereinigt und in 70 %igem Isopropylalkohol (Hedinger, Stuttgart, Deutschland) für 15 min desinfiziert. Abschließend wurden die PK erneut fünfmal in Aqua dest. gewaschen. Auch die Aufbewahrung der Proben erfolgte in sterilem Wasser.

Schienenherstellung

Zur Herstellung der PK-Trageschienen aus hartelastischen, transparenten Duran[®]-Folien (Maßen 125 mm x 125 mm x 1 mm; Scheu-Dental, Iserlohn, Deutschland) wurde eine Abformung der Ober- und Unterkiefer der Probanden mit Alginat (Blend-a-print Elastic-Alginat; Procter & Gamble, Schwalbach, Deutschland) genommen. Die Modelle wurden aus Superhartgips (Die-Stone Peach Klasse IV-Gips, Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland) hergestellt. Die für den ersten und zweiten Quadranten im Tiefziehverfahren (Erkopress ES 2004, Erkodent GmbH, Pfalzgrafenweiler, Deutschland) angefertigten Minioplastschienen bedeckten aus ästhetischen

und phonetischen Gründen nur den Molaren- und Prämolarenbereich. Die Schienen, die jeweils bukkal und palatinal 3 mm vor dem marginalen Sulkus endeten, wurden mit kleinen Löchern versehen, um den Proben einen besseren Halt zu geben.

Um raue und glatte Oberflächen vergleichen zu können, wurde jeweils die Hälfte eines jeden PK mit 37,5 %iger Phosphorsäure (Phosphoric Acid, Kerr Italia Srl., Scafati, Italien) für 30 s angeätzt. Jeweils zwei Dentin-PK wurden mit einem A-Silikon President light body (Coltène/Whaledent GmbH und Co. KG, Langenau, Deutschland) auf den Trageschienen befestigt. Die zwei Proben wurden bukkal rechts und links vom ersten Molaren (16 und 26) angebracht, wobei die geätzte Seite immer nach vorne zeigte (s. Abb. 3). Um die Ergebnisse besser vergleichen zu können, wurde auf eine einheitliche Ausrichtung, Lage und Verwendung der PK geachtet. Für die fluoreszenzmikroskopische Analyse (Axioskop, Axio Imager A1, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland) wurde der erste mesiale PK verwendet. Der zweite und somit hintere PK wurde für die REM-Untersuchungen (REM XL 30 ESEM FEG, Fei Company, Eindhoven, Niederlande) benutzt.

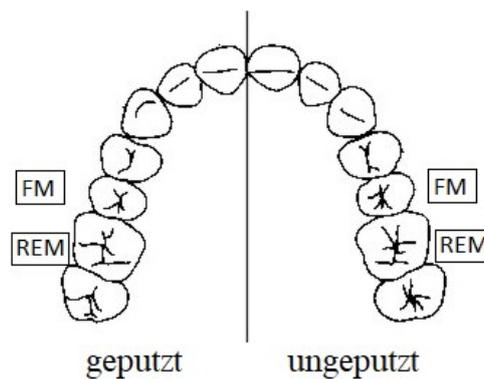


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Prüfkörperanordnung auf den Trageschienen.



Abbildung 4: Beispiel einer Prüfkörpertrageschiene

3.2.3 Prüfprodukte

Untersucht wurden vier Zahnpasten mit unterschiedlichen Inhaltsstoffen und Wirkmechanismen. Zusätzlich wurde eine Basiszahnpaste (B-P) mitgeführt, die die Grundinhaltsstoffe aller vier Testpasten, jedoch nicht HA oder CHX enthielt (s. Tab. 1). Als Negativkontrolle putzten die Probanden in einem Versuchsdurchgang nur mit Wasser.

Tabelle 1: Inhaltsstoffe der verwendeten Zahnpasten.

Paste	Abkürzung	Bestandteile
Hydroxylapatit-Paste *	HA-P	B-P , 8 % Hydroxylapatit, Aluminium-Lactat, Natrium-Fluorid 1360 ppm
Chlorhexidin-Paste **	CHX-P	B-P , Chlorhexidin Digluconat 0,05 %, Aluminium-Lactat, Aluminium-Fluorid 1360 ppm
Kräuterextrakt-Paste	H-P	B-P , Petersilienöl, Curcuma Xanthorrhiza Wurzel-extrakt, Natrium-Fluorid 990 ppm
Abrasiv-Paste	A-P	B-P , Aluminium-Lactat, Natrium-Fluorid 1360 ppm
Basis-Paste	B-P	Polyethylenglykol 32, Sorbitol, Hydroxyethylzellulose, Siliziumdioxid, Titandioxid, Natrium-Laurylsulfat ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$)

Alle Pasten von Dr. Theiss Naturwaren GmbH; * Lactalut White & Repair, ** Lactalut Aktiv.

3.2.4 Biofilmgewinnung

Alle fünf Probanden nahmen an sechs Testrunden teil:

- Runde 1: Kontrollgruppe: Wasser (W),
- Runde 2: Basispaste (B-P),
- Runde 3: Chlorhexidin-Paste (CHX-P),
- Runde 4: Kräuterextraktpaste (H-P),
- Runde 5: Abrasiv-Paste (A-P),
- Runde 6: Hydroxylapatit-Paste (HA-P).

Es wurden insgesamt 120 Dentin-PK für die Biofilmgewinnung verwendet. Die Teilnehmer erhielten für jede Runde zwei neue PK-Trageschiene (rechter und linker Oberkiefer) mit zwei PK in Aqua dest. und eine neue Zahnbürste.

Die Testphase erstreckte sich über ca. acht Wochen. Die Versuche starteten morgens um 8 Uhr (1/2 h nach dem normalen Zähneputzen). Die Tragedauer der Schienen betrug für jeden Versuch 24 h. Die Minioplastschienen durften nur während den Mahlzeiten entfernt werden. In dieser Zeit lagerten die Schienen in einer Feuchtkammer. Das Zähneputzen erfolgte nach 1/2 h, 12 h und 23,5 h nach Versuchsbeginn. Dazu wurden beide Schienen ausgezogen, der Oberkiefer geputzt und beide Schienen wieder eingesetzt. Danach wurde die rechte Schiene für 30 s geputzt, die linke Schiene blieb ungeputzt, kam aber mit dem Zahnpastaschaum (Zahnpasta-Speichel-Gemisch) in Berührung. Anschließend wurde der Unterkiefer geputzt und ausgespült. Für jeden Quadranten ergab sich so eine Putzdauer von 30 s. Nach 24 h wurden die PK entnommen und 5 s in Aqua dest. gereinigt. Dabei wurden Speichelrückstände sowie nicht adhärente Bakterien abgewaschen. Anschließend wurden die PK mittels Fluoreszenzmikroskop und REM untersucht. Zwischen jeder Testrunde lag eine Woche, in der die Probanden ihrer gewohnten Mundhygiene nachkamen. So wurden überlagernde Effekte der verschiedenen Inhaltsstoffe ausgeschlossen.

3.3 Untersuchungsmethoden

3.3.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die Vitalität der Bakterien im Biofilm und die Biofilmmenge wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie durch live-dead-staining dargestellt. Basierend auf Unterschieden in der Zellmembran färbten sich avitale Bakterien (beschädigte Zellmembran) rot und lebende Bakterien (intakte Membran) grün. Untersucht wurde der Einfluss der Testzahnpasten auf die Biofilmmenge und auf die Vitalität der Bakterien. Als Kontrolle dienten PK, die nur mit Wasser geputzt wurden. Die Expositionszeit der PK betrug 24 h.

Probenvorbereitung

Nach Entnahme wurden die PK sofort weiterverarbeitet, um eine Verschiebung des Verhältnisses zwischen toten und lebenden Bakterien auszuschließen. Nach dem Abspülen mit Aqua dest. wurden die PK mit einem „live-dead-staining“ Kit (BacLight® Bacterial Viability Kit L7012, Molecular Probes, Waltham/Massachusetts, USA) eingefärbt, das die beiden fluoreszierenden Farbstoffe SYTO 9 (grün) und Propidiumiodid (rot) beinhaltet. Je 1,5 µl dieser Nukleinsäurefarben (SYTO 9 und Propidiumiodid) wurden mit 500 µl NaCl (0,9 % NaCl, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) gemischt und gevortext (Vibrationsschüttler Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc., New York, USA). Die PK wurden in Mikrotiterplatten mit der Fluoreszenzlösung benetzt. Die Inkubation dauerte 10 min bei absoluter Dunkelheit. Danach wurde die Fluoreszenzlösung durch Schwenken der PK in NaCl abgespült und die Proben auf einen Objektträger (Leit-Taps, Art. Nr. G3347, Plano, Wetzlar, Deutschland) mit Silikon (Gamasil Tec A 85 base, Müller-Omricon GmbH & Co. KG, Lindlar, Deutschland) fixiert. Die PK-Oberfläche wurde mit Mountinöl des BacLight® Bacterial Viability Kit (L7012, Molecular Probes, Waltham/Massachusetts, USA) benetzt.

Bildgewinnung

Für die Untersuchung der PK wurde ein Fluoreszenzmikroskop (Axio Skop, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) und eine Bildverarbeitungssoftware (Axio Vision 29A, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet. SYTO 9 dringt in tote und lebendige Bakterien ein und färbt diese grün. Propidiumiodid gelangt hingegen nur in Bakterien mit geschädigter Zellmembran und reduziert dort den Anteil des SYTO 9. Daraus resultiert eine Rotfärbung avitaler Bakterien. SYTO 9 hat ein Emissionsmaximum von ca. 500 nm und Excitationsmaximum 480 nm.

Bei Propidiumiodid liegen die Maxima bei 635 nm (Emission) und 490 nm (Excitation). Von jeder Probe wurden fünf Bilder der geätzten und der polierten Seite bei einer 1000-fachen Vergrößerung aufgenommen.

Quantifizierung der Biofilmmenge

Die Quantifizierung der Biofilmmenge auf den PK erfolgte mit einer Skala von 0 - 6 (modifiziert nach Xiaoting Jin 2013 [Feng et al., 2015]). Das Scoring gibt die Menge an adhärenen Bakterien auf der Dentinoberfläche an und orientiert sich an den Phasen der Biofilmbildung (s. Abb. 5). Die Proben wurden von zwei Untersuchern unabhängig bewertet und bei Abweichungen wurde durch Diskussion eine Übereinstimmung erzielt.

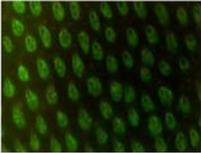
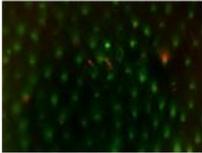
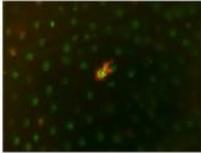
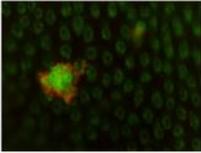
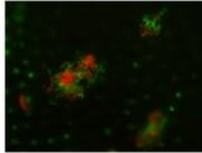
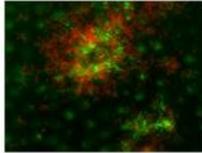
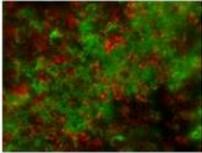
Score 0	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4	Score 5	Score 6
Keine Bakterien	Einzelne Bakterien/ Mikroorganismen	Kleine Bakterienkolonie, duzende Bakterien	Bakterienkolonie bis hunderte Bakterien	Multiple Bakterienkolonien, <50%der Fläche ist Biofilm	Multiple Bakterienkolonien, >50% der Fläche ist Biofilm	Multilayer Bakterien, >90% der Fläche ist Biofilm
						

Abbildung 5: Scoring zur Beurteilung der Biofilmmenge auf der Dentinoberfläche (Bildvergrößerung siehe Anhang).

Quantifizierung der Vitalität

Um neben der Biofilmmenge auch die Vitalität der Bakterien im Biofilm zu quantifizieren, wurde ein weiteres Scoring mit drei Kategorien (s. Abb. 6) verwendet, der den Anteil an vitalen und toten Bakterien auf der Dentinoberfläche wiedergibt. Bei der Untersuchungsreihe wurden nur die ungeputzten PK berücksichtigt, da bei den geputzten Dentin-PK die Biofilmbedeckung für aussagekräftige Ergebnisse zu niedrig war.

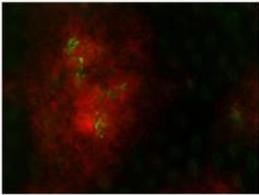
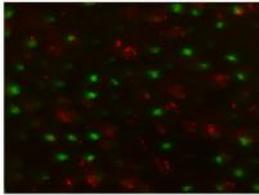
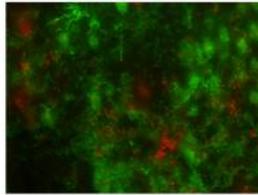
Score 1	Score 2	Score 3
Überwiegend tote Bakterien	Gleich viele tote und lebende Bakterien	Überwiegend lebende Bakterien
		

Abbildung 6: Scoring zur Beurteilung der Vitalität der Bakterien (Bildvergrößerung siehe Anhang).

3.3.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die REM diente der morphologischen Oberflächenanalyse der Dentin-PK. Alle Aufnahmen wurden unter Vakuum bei 5 kV mit demselben Mikroskop (REM XL 30 ESEM FEG, Fei Company, Eindhoven Niederlande) angefertigt. Nach einer Übersichtsaufnahme des kompletten PK wurde eine repräsentative Stelle auf der geätzten und polierten Seite bei 2.000, 5.000 und 10.000-facher Vergrößerung aufgenommen.

Probenvorbereitung für die REM

Nach Entnahme von den Minioplastschienen wurden die REM-PK mit Aqua dest. abgespült. Anschließend wurden sie für 2 h in eine Fixierlösung aus 2,5 %igem Glutaraldehyd (Glutaraldehyd Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7, Cacodylatsäure Natriumsalz Trihydrat, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Deutschland) bei 4°C gelegt. Danach wurden die Proben fünfmal in 0,1 M Cacodylatpuffer für jeweils 10 min gespült. Es folgte die Entwässerung der Biofilme durch eine aufsteigende Alkoholreihe (s. Tab. 2). Nach der Entwässerung wurden die PK 30 min mit Hexamethyldisilazan (HMDS, (CH₃)₃SiNH, 98,5 %, ABCR GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) benetzt und anschließend luftgetrocknet.

Tabelle 2: Fixierung der PK für die Rasterelektronenmikroskopie.

Glutaraldehyd 2,5 %	Cacodylat-Puffer	Alkoholreihe						HMDS
		50 %	60 %	70 %	80 %	90 %	100 %	
2 h	5 x	3 x					3 x	
	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	30 min

Danach wurden die vorbereiteten Proben mit einer leitfähigen Klebefolie (Leit-Taps, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) auf einem Al-Probeteller (Specimen Stubs, Agar Scientific Ltd, Essex, England) fixiert und mit einer dünnen Schicht aus Gold-Palladium-Partikeln besputtert (Sputter Coater SC 7640, Polaron Equipment Ltd-Quorum technologies, Newhaven, England).

EDX-Analyse

Zur EDX-Analyse der Dentinoberfläche mit dem darauf befindlichen Biofilm und den Zahnpastarückständen wurde von den PK eine REM-Aufnahme bei 5000-facher Vergrößerung angefertigt und anschließend mit der energiedispersiven Röntgenspektroskopie (EDX Phoenix, EDAX Inc., Mahwah, USA) untersucht. Bei dieser EDX-Analyse lag die Nachweisgrenze für die Elemente mit einer Ordnungszahl größer als 10 bei 0,1 Gew.-%.

3.4 Statistik

Zum Vergleich der Median-Scorewerte für die Biofilmbedeckung und -vitalität wurden der Wilcoxon Test und der Mann-Whitney U Test verwendet [Marx et al., 2016]. Zuerst wurden die gepaarten Prüfkörper mit polierter und geätzter Oberfläche mit dem Wilcoxon Test bewertet. Danach wurden die geputzten und die ungeputzten PK mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen. Die Pasten B-P, HA-P, H-P, A-P und CHX-P wurden zunächst gegen die Negativkontrolle Wasser und danach gegen die HA-Paste mit dem Mann-Whitney U Test getestet. Bei einem p-Wert < 0,05 wurden die Unterschiede als statistisch signifikant bewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen mit dem Fluoreszenzmikroskop

Durch die fluoreszenzmikroskopische Analyse wurde die Biofilmmenge bestimmt, die sich nach 24 h auf den geputzten sowie ungeputzten PK gebildet hatte. Weiter wurde auch das Verhältnis von toten zu lebenden Bakterien auf den PK nach 24 h Tragezeit ermittelt. Von allen PK wurden jeweils fünf Bilder der geätzten und der polierten Seite angefertigt. Dabei dienten die PK, die mit Wasser geputzt wurden, als Referenzdaten.

4.1.1 Anordnung der Bakterien

Auf den fluoreszenzmikroskopischen Bildern ließ sich erkennen, welche Bakterienformen auf den PK vorlagen und ob die Bakterien einzeln, in Ketten oder als Kolonien vorkamen.

Die Dentintubuli zeigten im Fluoreszenzmikroskop eine gewisse Eigenfluoreszenz (s. Abb. 7). Diese wurde jedoch bei der Auswertung der Proben vernachlässigt. Auch Epithelzellen, die sich durch Wangenkontakt auf den PK ablagerten, wurden bei den Ergebnissen nicht berücksichtigt, da sie unabhängig von den verwendeten Zahnpasten vorkamen.

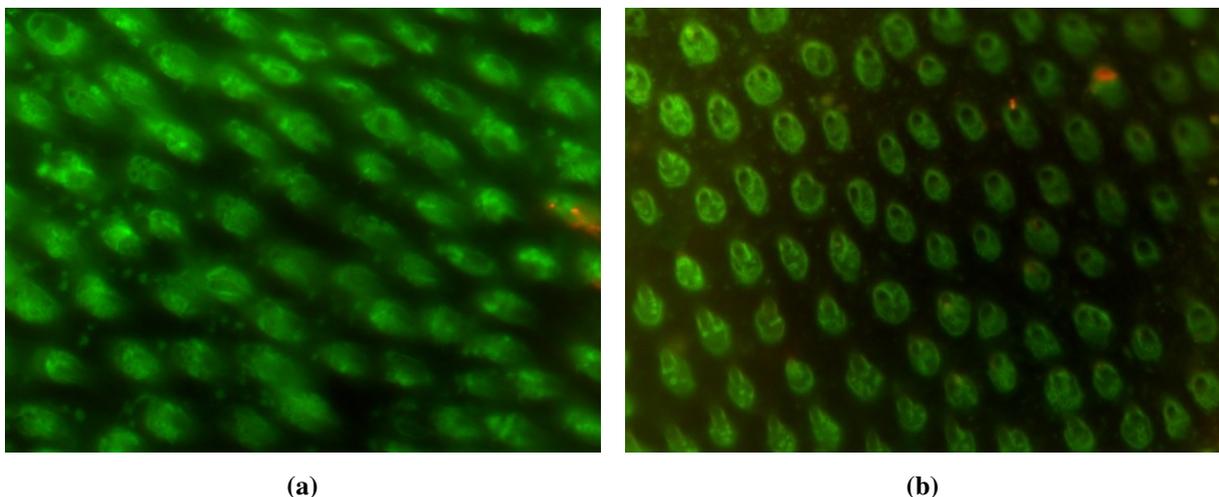


Abbildung 7: Eigenfluoreszenz der Dentintubuli: (a) HA-P geputzt, geätzt, (b) CHX-P geputzt poliert, PK mit Eigenfluoreszenz und Zahnpastarückständen in den Dentintubuli (fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen). Grün vitale Bakterien; Rot: avitale Bakterien. Original Vergrößerung 1000-fach.

Auf den PK waren überwiegend Kokken zu erkennen; vereinzelt wurden auch Stäbchen nachgewiesen. Die ungeputzten PK wiesen überwiegend Kolonien auf, wohingegen die geputzten PK eher vereinzelte Bakterien und Ketten zeigten (s. Abb. 8).

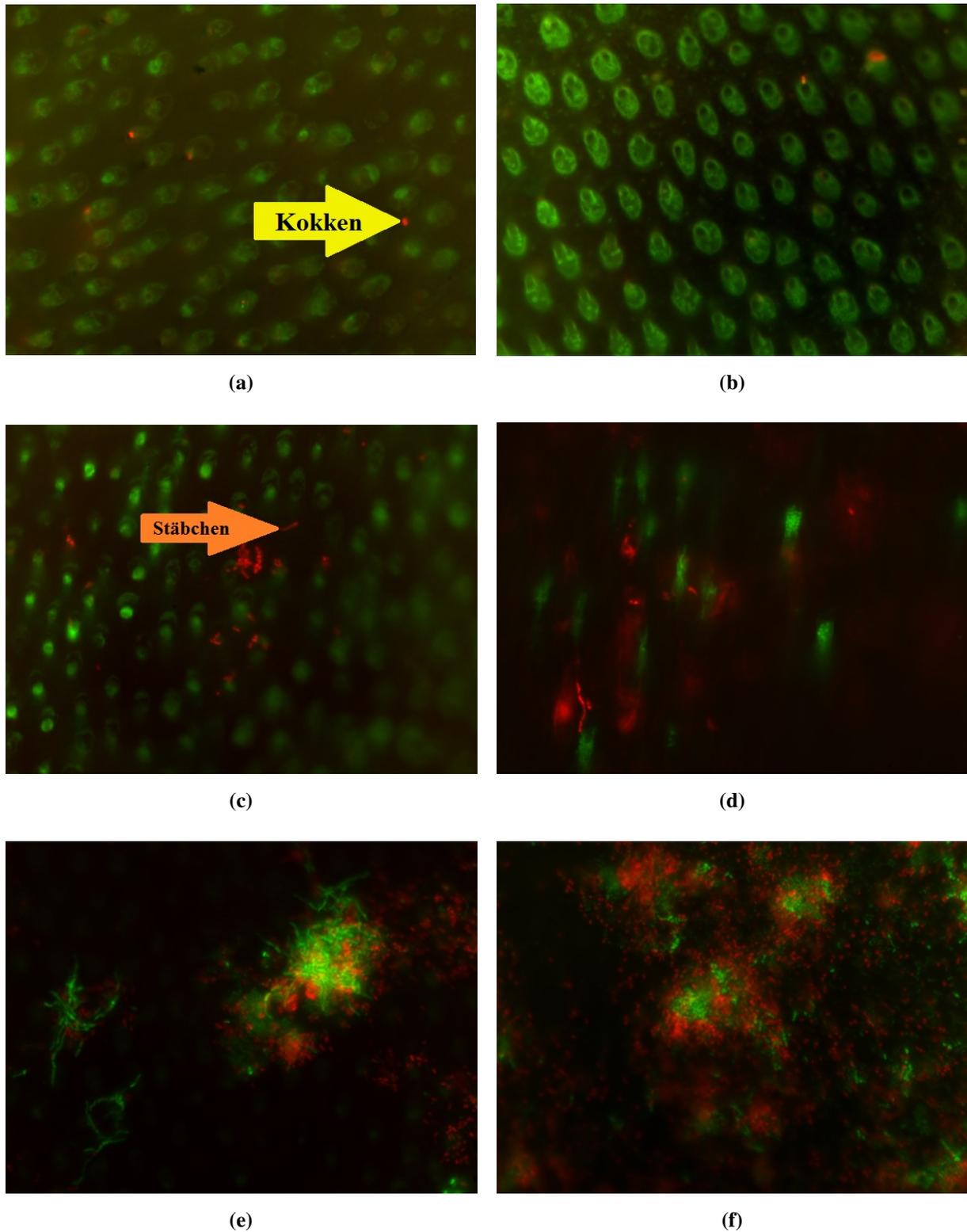


Abbildung 8: Anordnung der Bakterien im 24-h-Biofilm: Vereinzelte Bakterien (a-b), Ketten (c-d) und Kolonien (e-f); (a und b) CHX-P geputzt, (c) A-P geputzt, (d) H-P geputzt, (e) HA-P ungeputzt, (f) Wasser ungeputzt (fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen). Grün vitale Bakterien; Rot: avitale Bakterien. Original Vergrößerung 1000-fach.

4.1.2 Biofilmmenge

Bei der Auswertung der Biofilmmenge wurde das Scoring beschrieben in Abbildung 5 verwendet. Nach 24 h Tragezeit war die Biofilmbildung bei den ungeputzten PK im Vergleich zu den mechanisch gereinigten PK signifikant erhöht ($p < 0,0001$ s., s. Abb. 9). Ein signifikanter Unterschied zwischen geätzter und polierter Seite konnte bei den geputzten PK ebenfalls nachgewiesen werden ($p < 0,015$ s.).

Ungeputzte Seite

Auf der ungeputzten Seite waren keine signifikanten Unterschiede zwischen polierter und geätzter Fläche ersichtlich ($p = 0,147$ n.s.). Im Vergleich zu der Versuchsreihe mit Wasser wiesen lediglich die Proben der HA-P einen signifikanten Unterschied auf ($p < 0,014$ s.). Untersuchte man die Testpasten im Vergleich zur HA-P konnten nur die PK der H-P ($p < 0,007$ s.) und A-P ($p < 0,005$ s.) signifikante Unterschiede zu den Proben der HA-P vorweisen.

Teilweise waren auf den ungeputzten PK kleine Bakterienkolonien, aber auch mehrschichtig organisierte Biofilme zu erkennen.

Die geringste Biofilmbildung zeigten die Proben der HA-P. Auch bei der Versuchsreihe der CHX-P waren die ungeputzten PK im Schnitt zu weniger als 50 % der Gesamtoberfläche mit Bakterienkolonien bedeckt. Außer bei den Versuchen mit der HA-P, H-P und CHX-P waren alle ungeputzten PK auf der geätzten Seite von einer stärkeren Biofilmbildung betroffen als auf der polierten Seite. Die PK der HA-P, H-P und CHX-P wiesen eine vergleichbare Biofilmbedeckung auf der geätzten sowie der polierten Seite auf. Die Proben der B-P zeigten auf der geätzten und polierten Oberfläche eine größere Biofilmbedeckung wie die PK der CHX-P aber eine kleinere als die mit Wasser oder A-P geputzten PK. Die größte Biofilmbedeckung bei den ungeputzten PK trat bei den Proben der Versuchsreihe Wasser-, H-P und A-P- auf (s. Abb. 12 + 13).

Geputzte Seite

Auch auf den geputzten PK waren nach 24 h Tragezeit mehrheitlich einzelne Bakterien/ Mikroorganismen, sowie Bakterienkolonien nachweisbar (s. Abb. 10, unten). Die Biofilmbildung war bei allen verwendeten Zahnpasten auf der geätzten Seite stärker. Es konnte somit ein signifikanter Unterschied zwischen geätzter und polierter Seite festgestellt werden ($p < 0,0015$ s.). Vergleich man die Ergebnissen der HA-P mit denen der anderen Testpasten konnten statistisch gesehen nur signifikante Unterschiede zu der Versuchsreihe mit Wasser ($p < 0,001$ s.) und H-P ($p < 0,001$ s.) analysiert werden. Alle Pasten außer die H-P ($p = 0,054$ n.s.) und die B-P ($p = 0,6$ n.s.) unterschieden sich signifikant im Vergleich zu der Versuchsreihe mit Wasser (A-P: $p < 0,033$ s.; CHX-P: $p < 0,026$ s.; HA-P: $p < 0,001$ s.).

Die PK, die mit der HA-P geputzt wurden, zeigten nur vereinzelt Mikroorganismen und die geringste Biofilmbildung. Die mit der CHX-P und der A-P gereinigten PK wiesen durchschnittlich nur eine geringfügig höhere Bakterienbesiedelung auf, als die PK der HA-P. Bei der Versuchreihe mit der A-P traten im Vergleich zur HA- und CHX-P große interindividuelle Unterschiede zwischen den Probanden auf. Die mit Wasser und der H-P geputzten Dentin-PK zeigten die größte Biofilmbildung mit kleineren und größeren Bakterienkolonien. Eine Reinigung der PK mit der B-P verringerte im Vergleich zu einer Behandlung mit Wasser oder H-P die Biofilmbildung nur geringfügig. Bei den polierten Proben, die mit der B-P gereinigt wurden konnte eine vergleichbare Biofilmbildung beobachten werden, wie bei denen die mit der CHX-P gereinigt wurden (s. Abb. 12 + 13).

In Abbildung 9 ist eine Zusammenfassung über die Biofilmbildung auf den Dentinprüfkörpern dargestellt. Das Diagramm stellt einen Vergleich zwischen geputzten und ungeputzten PK sowie geätzter und polierter Fläche dar.

Die Boxplot-Diagramme in Abbildung 10 bieten eine Übersicht über die Biofilmbedeckung der PK bei Verwendung der verschiedenen Zahnpasten und verdeutlichen die Wirkung der HA-P und CHX-P auf die Biofilmbildung der geputzten und ungeputzten Proben.

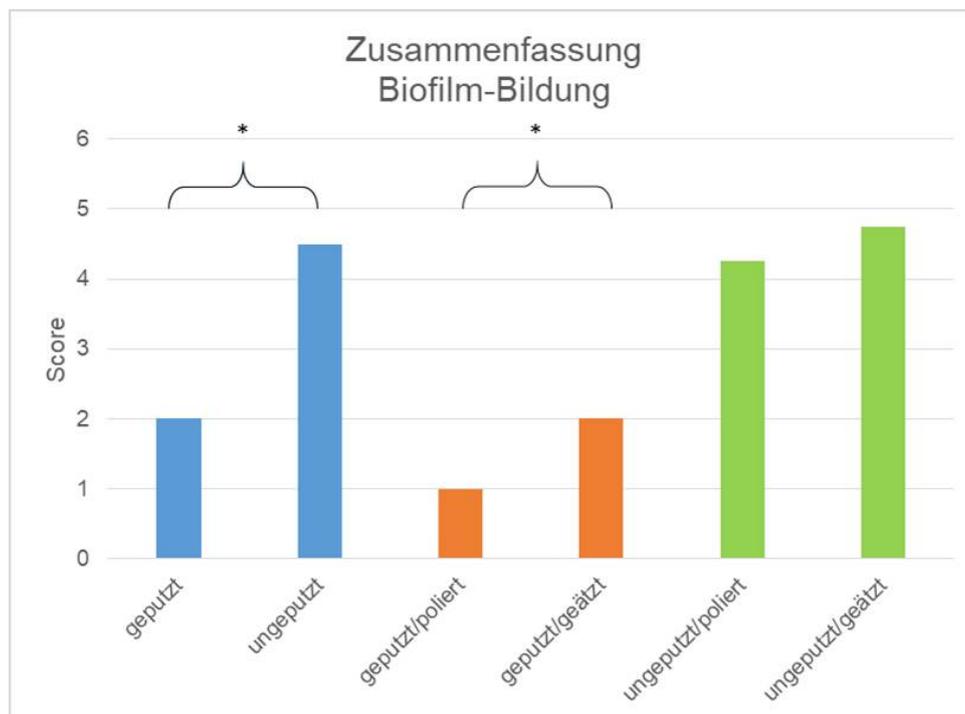


Abbildung 9: Gegenüberstellung der Medianwerte der Biofilmbildung zwischen geputzten/ ungeputzten PK (blaue Boxplot-Balken); geputzt, polierten/ geputzt ,geätzten PK (orange Boxplot-Balken), sowie ungeputzt, polierten und ungeputzt geätzten PK (grüner Boxplot-Balken). Signifikante Unterschiede wurden mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$). Die ungeputzten PK (geätzt/ poliert) wiesen keine signifikante Unterschiede auf. Score 0: Keine Bakterien, Score 1: Einzelne Bakterien/ Mikroorganismen, Score 2: Kleine Bakterienkolonien, dutzende Bakterien, Score 3: Bakterienkolonien, bis hunderte Bakterien. Score 4: Multiple Bakterienkolonien, <50 % der Fläche von Biofilm bedeckt, Score 5: Multiple Bakterienkolonien, >50 % der Fläche von Biofilm bedeckt, Score 6: Multilayer Bakterien >90 % der Fläche ist Biofilm (s. Abb. 5)

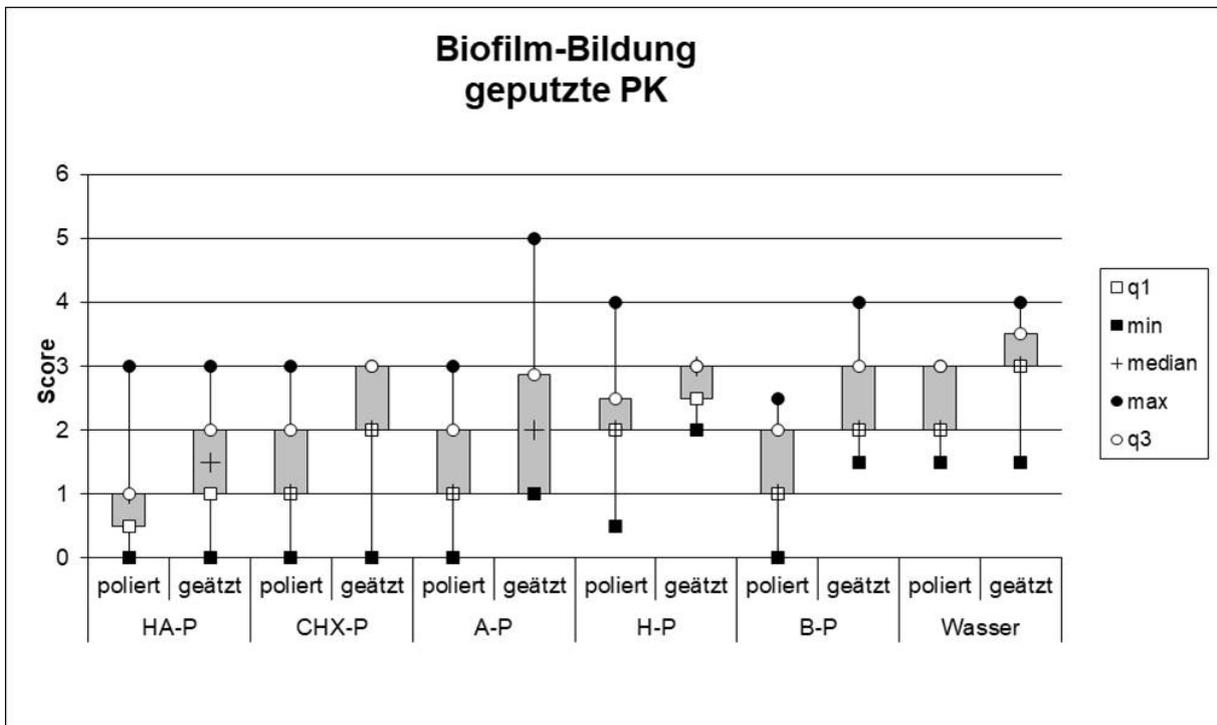
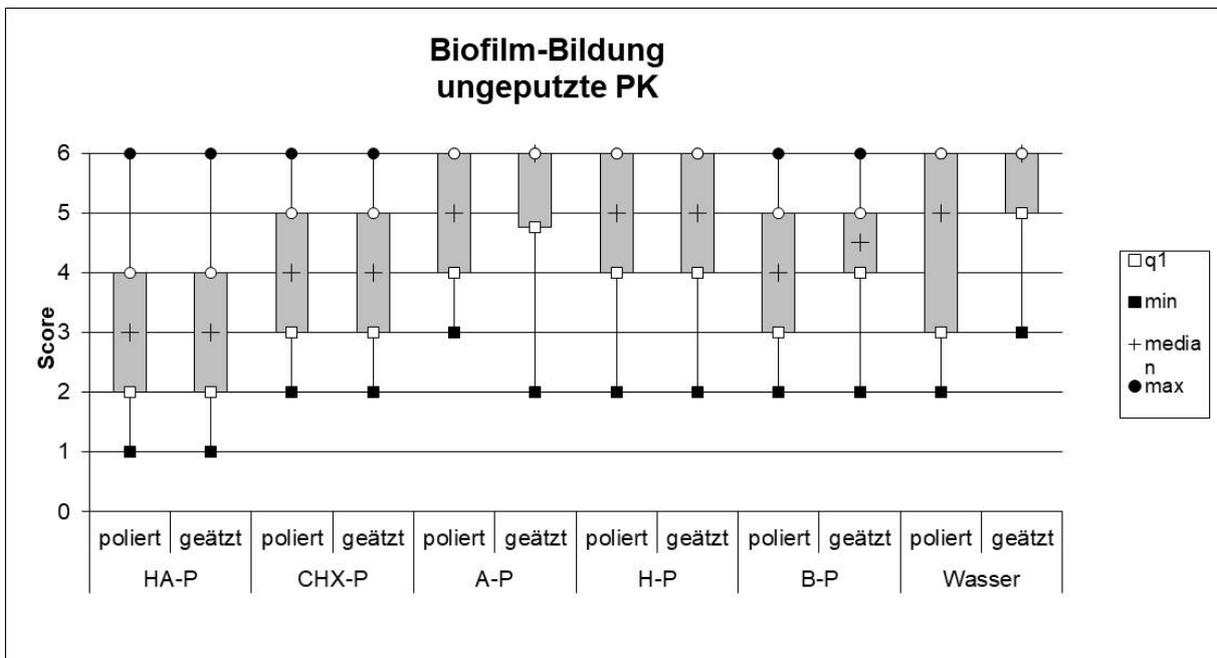


Abbildung 10: Biofilmbildung nach 24 h auf den ungeputzten (oben) und geputzten (unten), geätzten sowie polierten PK nach dem Scoring von Abb. 5.

In den meisten Dentintubuli der geätzten, aber auch teilweise der polierten Seite konnten Bakterien nachgewiesen werden (s. Abb. 11). Dieses Phänomen zeigte sich in allen Versuchsreihen.

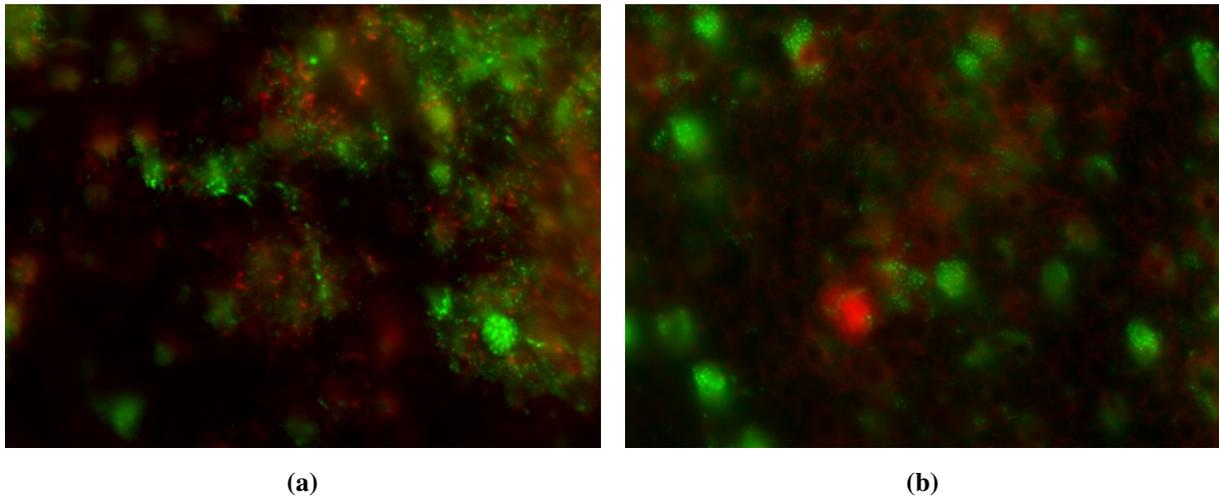


Abbildung 11: Vermehrte Bakterienaggregation in den Dentintubuli auf der geätzten Seite der PK: (a) Wasser ungeputzt, geätzt, (b) A-P ungeputzt, geätzt (fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen). Grün vitale Bakterien; Rot: avitale Bakterien. Original Vergrößerung 1000-fach.

In Abbildung 12 sind repräsentative Aufnahmen der Proben der getesteten Zahnpasten für die ungeputzte und geputzte Seite gegenübergestellt. Abbildung 13 zeigt Aufnahmen von den Referenz-PK, die mit Wasser geputzt wurden und Aufnahmen der PK aus Versuchen mit der B-P.

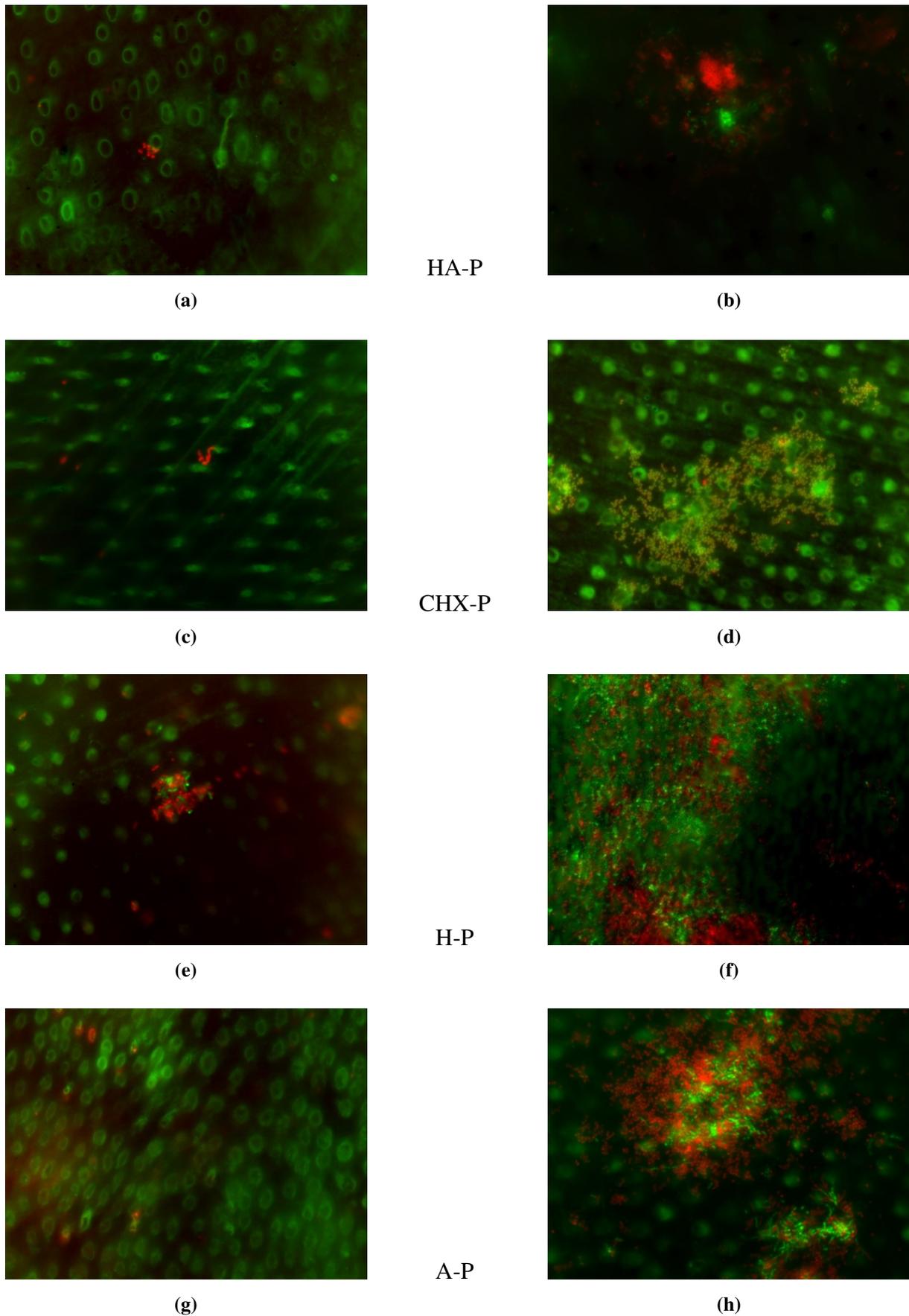


Abbildung 12: Gegenüberstellung der Biofilmbildung nach 24 h auf den geputzten (a, c, e, g) und den ungeputzten PK (b, d, f, h) der getesteten Zahnpasten: (a und b) HA-P, (c + d) CHX-P, (e + f) H-P, (g + h) A-P. Grün: lebende Bakterien; rot: tote Bakterien (fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen). Grün vitale Bakterien; Rot: avitale Bakterien. Original Vergrößerung 1000-fach.

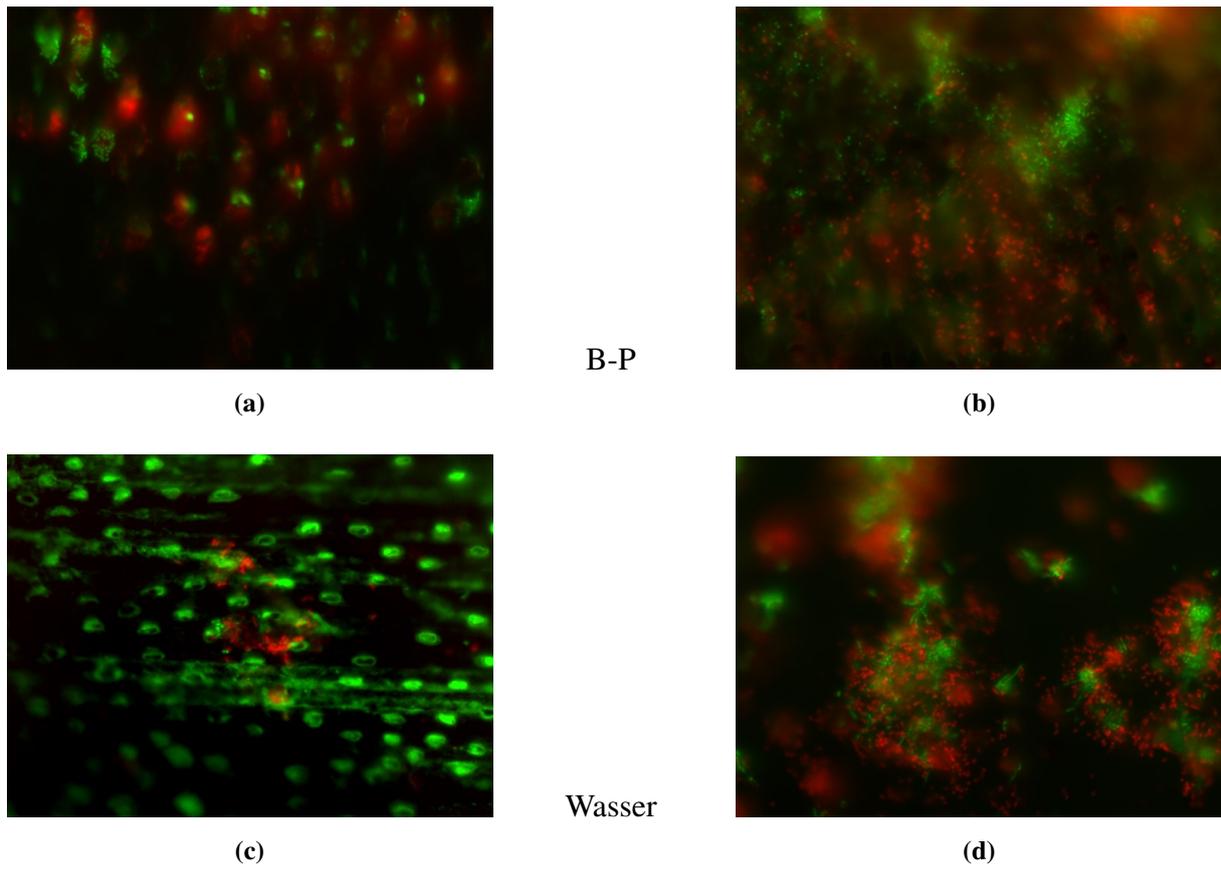


Abbildung 13: Gegenüberstellung der Biofilmbildung nach 24 h auf den geputzten (a, c) und den ungeputzten PK (b, d) der Kontrollgruppe Wasser und der B-P: (a und b) B-P, (c + d) Wasser (fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen). Grün vitale Bakterien; Rot: avitale Bakterien. Original Vergrößerung 1000-fach.

4.1.3 Vitalitätsbestimmung

Im Gegensatz zur Biofilmbildung traten bei der Bestimmung der Bakterienvitalität auf den PK große interindividuelle Unterschiede auf. In die Auswertung wurden nur die ungeputzten PK einbezogen, da auf der Oberfläche der geputzten PK der Biofilm für eine Vitalitätsmessung nicht ausreichte.

Da keine signifikanten Unterschiede zwischen geätzter und polierter Seite festgestellt werden konnten ($p=0,47$ n.s.), wurde bei der Erstellung des Diagramms in Abbildung 15 die polierten und geätzten Flächen nicht getrennt voneinander betrachtet. Aus Übersichtsgründen sind in Abbildung 16 jedoch die Ergebnisse der geätzten und polierten Flächen getrennt voneinander dargestellt.

Vergleicht man die Ergebnisse der Versuchsreihe Wasser mit denen der HA-P konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Ebenfalls konnten keine Abweichungen zwischen der HA-P und den anderen Zahnpasten ausgemacht werden. Lediglich bei der Gegenüberstellung Wasser und A-P konnten signifikante Differenzen ermittelt werden ($p<0,0018$ s.).

Auf der polierten Seite der PK der HA-P befanden sich überwiegend avitale Bakterien. Die Ergebnisse waren mit den PK vergleichbar, die mit der CHX-P in Berührung kamen. Auf der geätzten Seite dieser Versuchsreihe wurden hingegen, überwiegend grün-fluoreszierende und somit vitale Bakterien im Biofilm nachgewiesen.

Die ungeputzten PK, die mit Wasser umspült wurden, wiesen überwiegend vitale Bakterien auf. Im Gegensatz dazu führte das Umspülen mit der CHX-P und der A-P vor allem bei den geätzten, aber auch bei den polierten PK zu einer Abnahme der Bakterienvitalität im Biofilm, so dass bei diesen Proben avitale Bakterien überwogen.

Die PK der B-P zeigten unabhängig von der Rauigkeit der Oberfläche im Schnitt gleich viele avitale und vitale Bakterien. Das Gleiche galt für die PK der H-P, jedoch traten große interindividuelle Unterschiede auf. Dabei konnten, wie auch bei der Versuchsreihe mit Wasser und HA-P, auf der geätzten Seite geringfügig mehr vitale Bakterien beobachtet werden als auf der polierten Fläche.

In Abbildung 14 sind die geätzten und polierten Flächen der ungeputzten PK gegenübergestellt. Diese Abbildung fasst alle Zahnpasten und die Negativkontrolle (W) zusammen.

Die Diagramme zum statistischen Vergleich der Pasten sind in Abbildung 15 und 16 dargestellt.

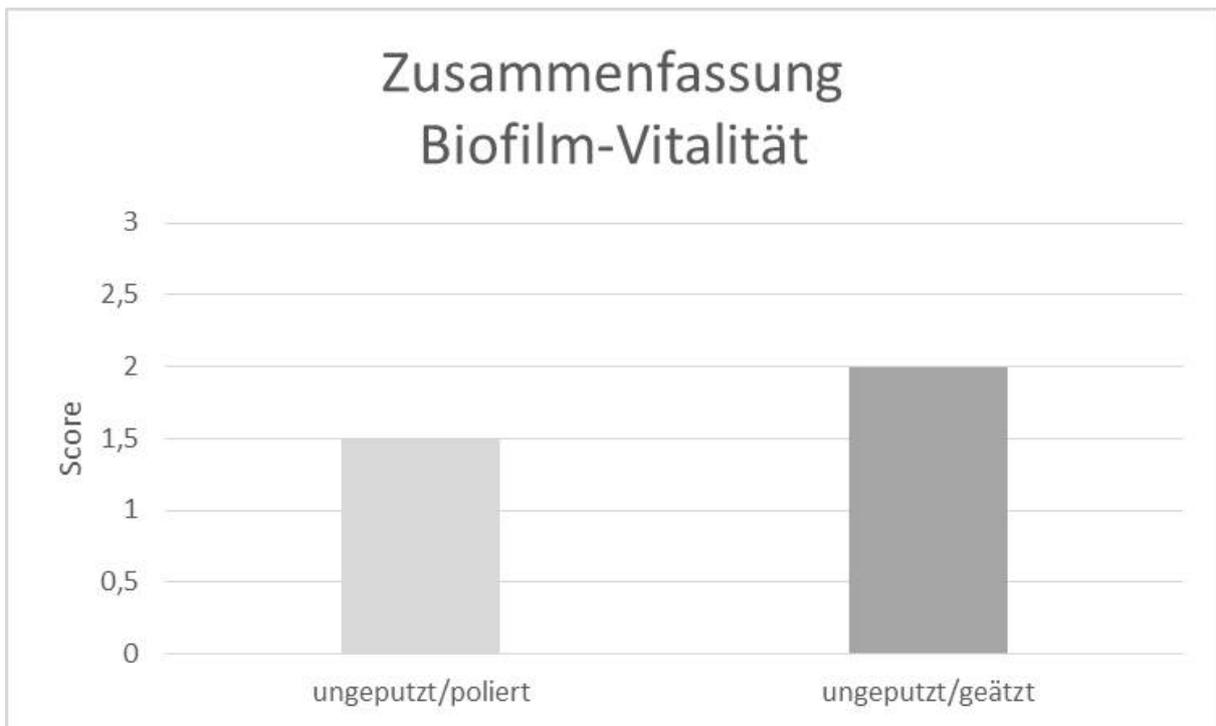


Abbildung 14: Gegenüberstellung der Medianwerte der ungeputzt, polierten gegen die ungeputzt geätzten PK. Es konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Score 1: Überwiegend tote Bakterien, Score 2: Vergleichbar viele tote und lebende Bakterien, Score 3: Überwiegend lebende Bakterien (s. Abb. 6).

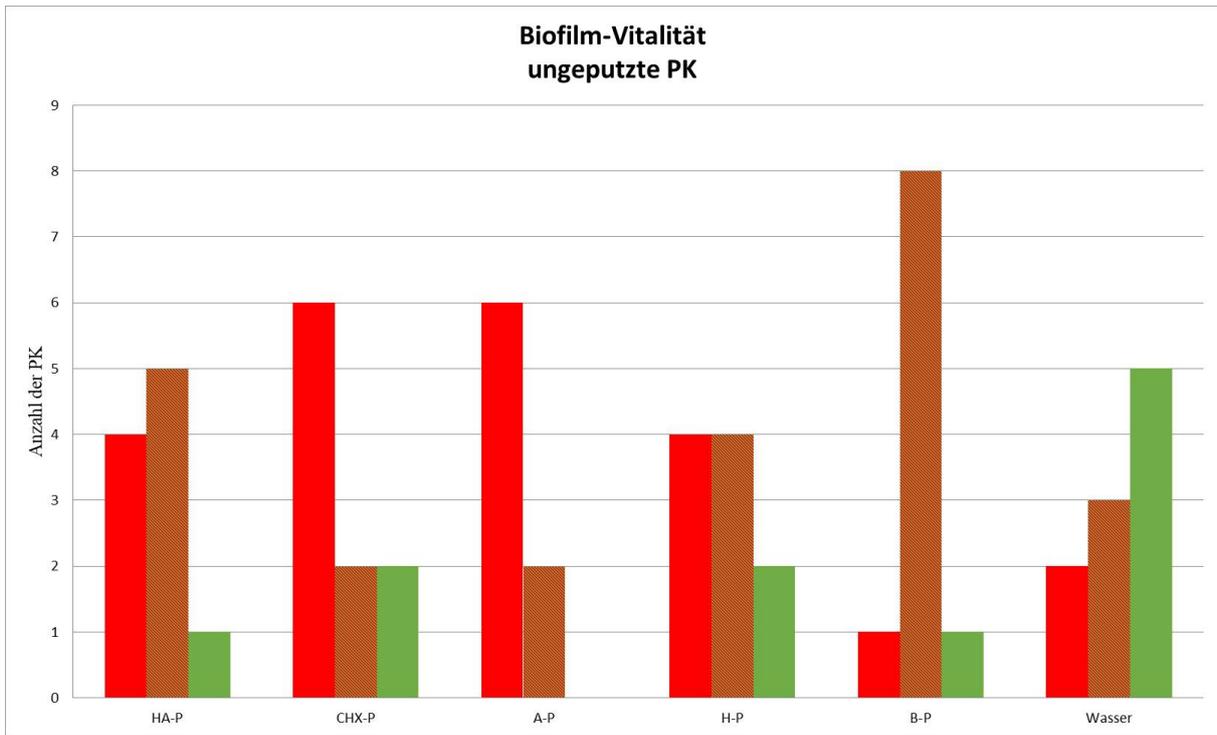


Abbildung 15: Vitalität der Mikroorganismen im Biofilm auf den ungeputzten PK. Score 1: Überwiegend tote Bakterien, Score 2: Vergleichbar viele tote und lebende Bakterien, Score 3: Überwiegend lebende Bakterien (s. Abb. 6).

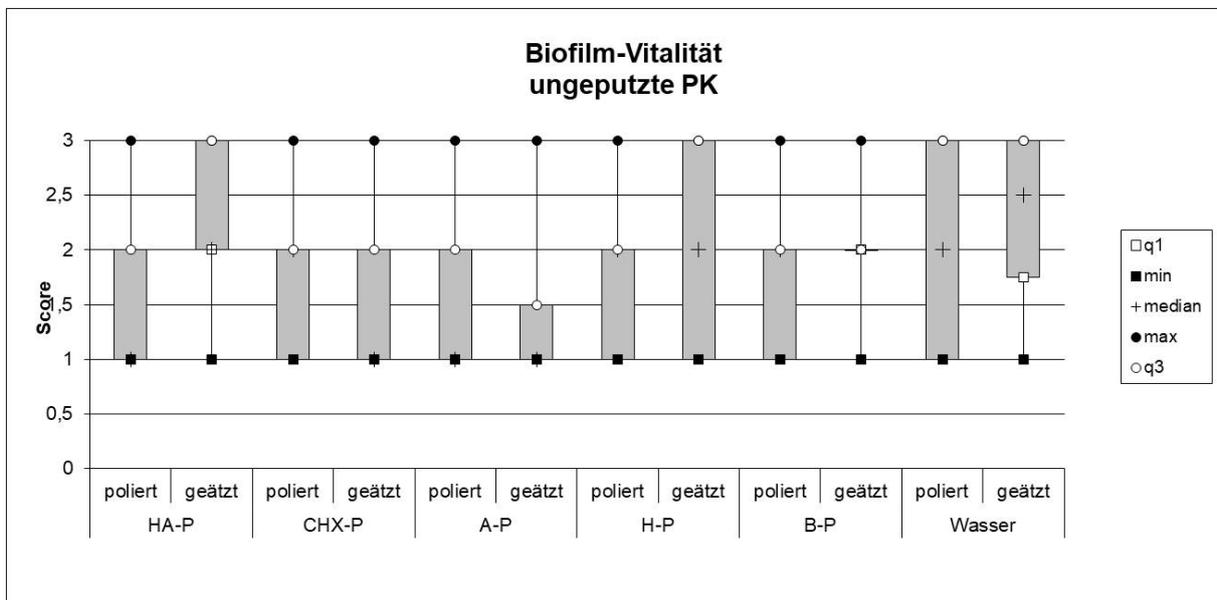


Abbildung 16: Vitalität der Bakterien im Biofilm auf den ungeputzten, geätzten sowie polierten PK. Score 1: Überwiegend tote Bakterien, Score 2: Vergleichbar viele tote und lebende Bakterien, Score 3: Überwiegend lebende Bakterien (s. Abb. 6).

4.2 Biofilmanalyse mit dem Rasterelektronenmikroskop

Als weitere Methode zur Visualisierung des 24-h-Biofilms auf den PK wurde die REM verwendet. Zur morphologischen Beschreibung wurden die Biofilmmenge und die Struktur untersucht. Dabei waren individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Probanden und PK erkennbar. Auf den PK wurden, wie in der fluoreszenzmikroskopischen Analyse, überwiegend adhärente Kokken und nur vereinzelt Stäbchen auf der Dentinoberfläche nachgewiesen (Abb. 17 a + b).

Die geputzte Seite zeigte in allen Versuchsreihen im Vergleich zur ungeputzten Seite eine Reduktion der Biofilmbildung und der Anzahl der Bakterien. Dies ist auf die mechanische Reinigung der PK zurückzuführen. Geätzte PK zeigten zumeist eine höhere Biofilmbedeckung als polierte PK. Zusätzlich setzten sich in den Tubuli der geätzten PK mehr Mikroorganismen und Zahnpastarückstände ab als in den Kanälchen der polierten PK.

Die ungeputzten PK der Versuchsreihe Wasser zeigten einen mehrschichtig organisierten Biofilm mit vereinzelter Auflagerung von Stäbchen und Kokken. Unterschiede zwischen der geätzten und polierten Seite waren nicht detektierbar (Abb. 17 c + d). Die Dentintubuli waren mehrheitlich mit Biofilm bedeckt und kaum sichtbar. Lediglich bei zwei Probanden waren auf der polierten Seite weniger Bakterien erkennbar als auf der geätzten Fläche (Abb. 17 e + f).

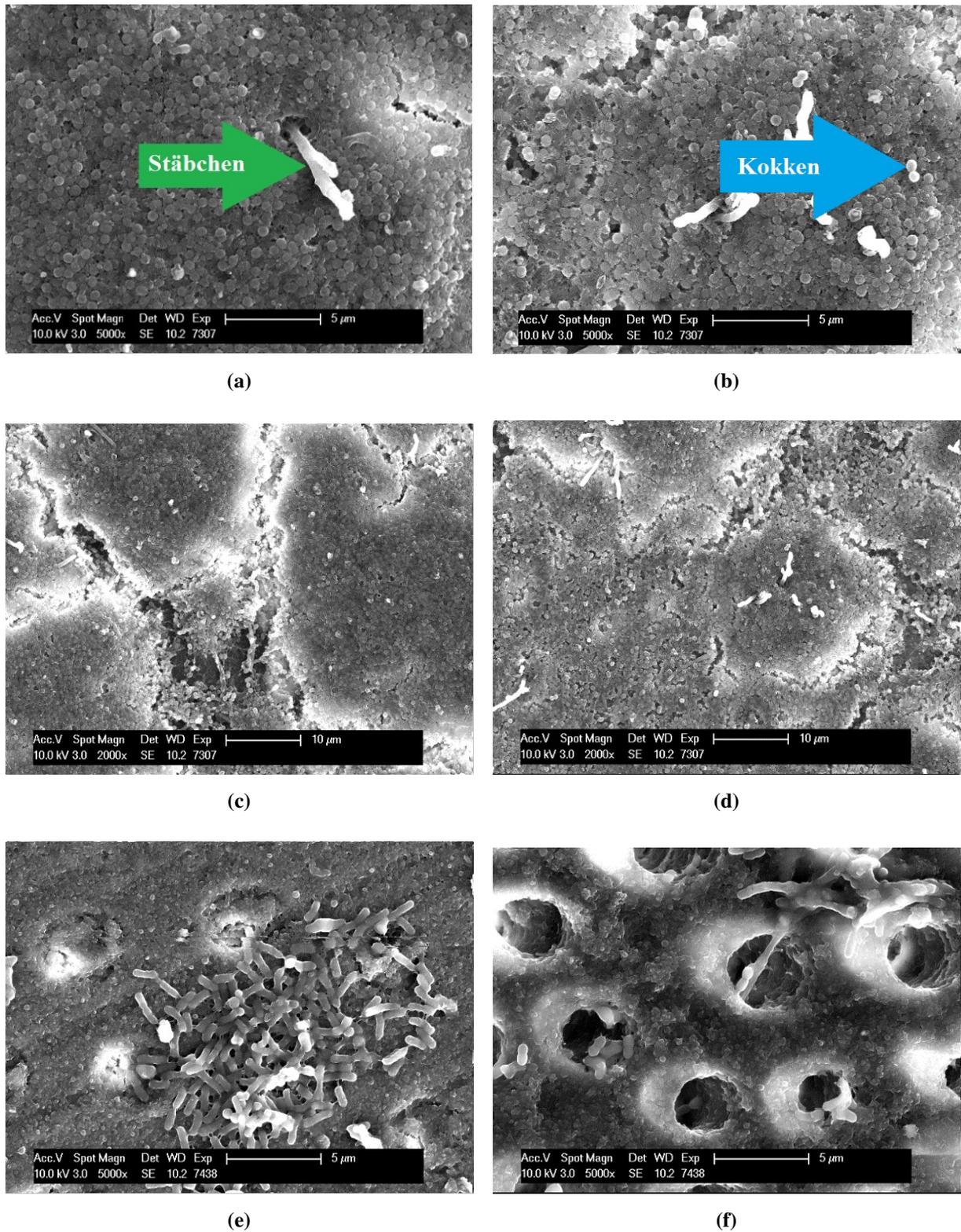


Abbildung 17: Ungeputzte PK mit 24 h *in situ* Biofilm der Kontrolle (Wasser): (a + b) geätzter PK mit überwiegend Kokken und nur vereinzelt Stäbchen, (c) geätzter PK mit mehrschichtig organisiertem Biofilm, (d) polierter PK mit mehrschichtig organisiertem Biofilm, (e) geätzter PK: Biofilm mit aufgelaagerten Kokken und Stäbchen, (f) polierter PK mit Stäbchen und Kokken in den Dentintubuli und auf der Dentinoberfläche, (REM-Aufnahmen). Originalvergrößerung (a, b, e, f) 5000-fach; (c + d) 2000-fach.

Bei den ungeputzten PK lagerten sich vermehrt Zahnpastarückstände auf der Dentinoberfläche und in den Dentintubuli ab. Die geringste Biofilmmenge zeigte sich bei den ungeputzten PK in der Versuchsreihe der HA-P und der CHX-P. Hier lagerten sich die Mikroorganismen vorzugsweise in den Tubuli ab (Abb. 18 a-d).

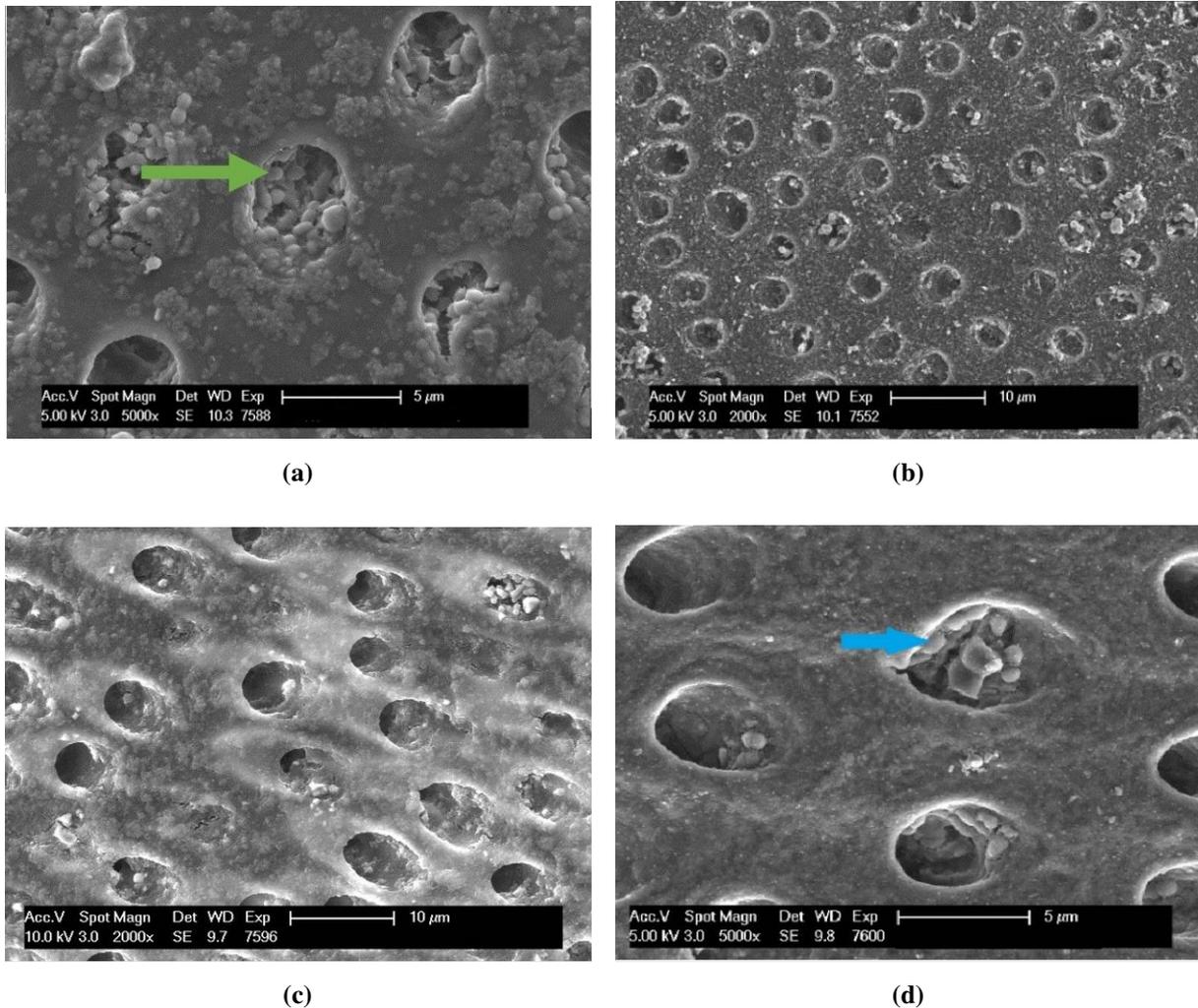


Abbildung 18: 24 h *in situ* Biofilm auf ungeputzten PK; Ablage der Mikroorganismen (grüner Pfeil) und Zahnpastarückständen (blauer Pfeil) in den Tubuli und auf der Dentinoberfläche: (a + b) HA-P, (c + d) CHX-P. Originalvergrößerung (b + c) 2000-fach; (a + d) 5000-fach.

Auch bei den geputzten PK waren Zahnpastarückstände in den Dentinkanälchen erkennbar. Auf der geätzten Seite waren mehr Zahnpastarückstände in den Tubuli vorhanden als auf den polierten PK. Am deutlichsten war dies bei den Versuchen der HA-P zu beobachten, wo die Tubuli der PK wie aufgefüllt wirkten (s. Abb. 19).

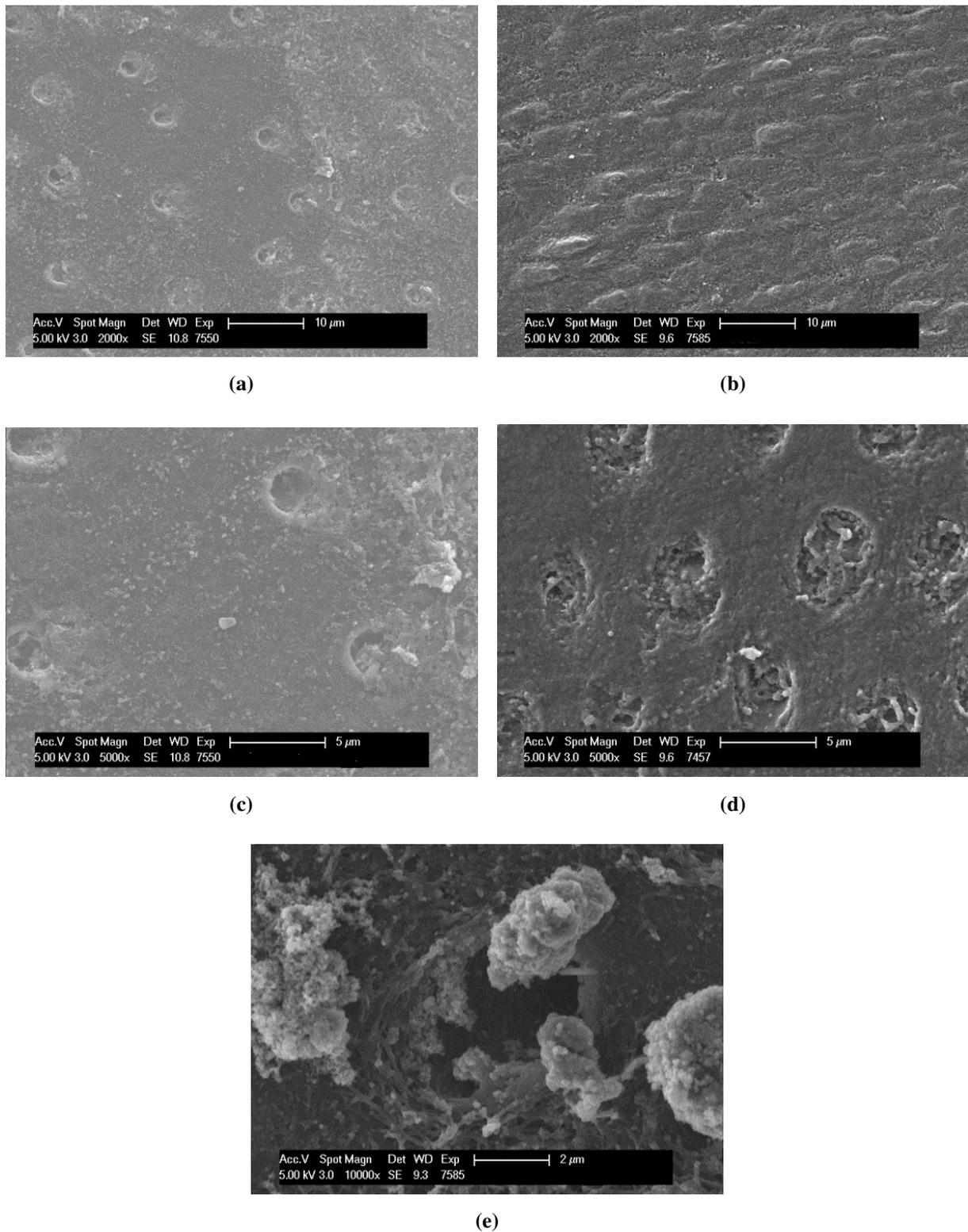


Abbildung 19: Zahnpastarückstände der HA-Paste auf der geputzten Dentinoberfläche und in den Dentintubuli in 2000-, 5000-, und 10000-facher Vergrößerung: geätzte PK (b, d + e); polierte PK (a + c) (REM-Aufnahmen). Originalvergrößerung (a + b) 2000-fach, (c + d) 5000-fach, (e) 10000-fach.

Bei der Versuchsreihe mit der HA-Paste konnten zusätzlich vereinzelte größere Siliziumdioxid-Putzkörper auf der Dentinoberfläche nachgewiesen werden. Diese Kristalle wurden durch EDX-Analysen als Siliziumdioxid verifiziert (Abb. 24a + b, 25). Diese traten auch bei den PK die mit der A-P umspült oder geputzt wurden in ähnlicher Menge auf (Abb. 20).

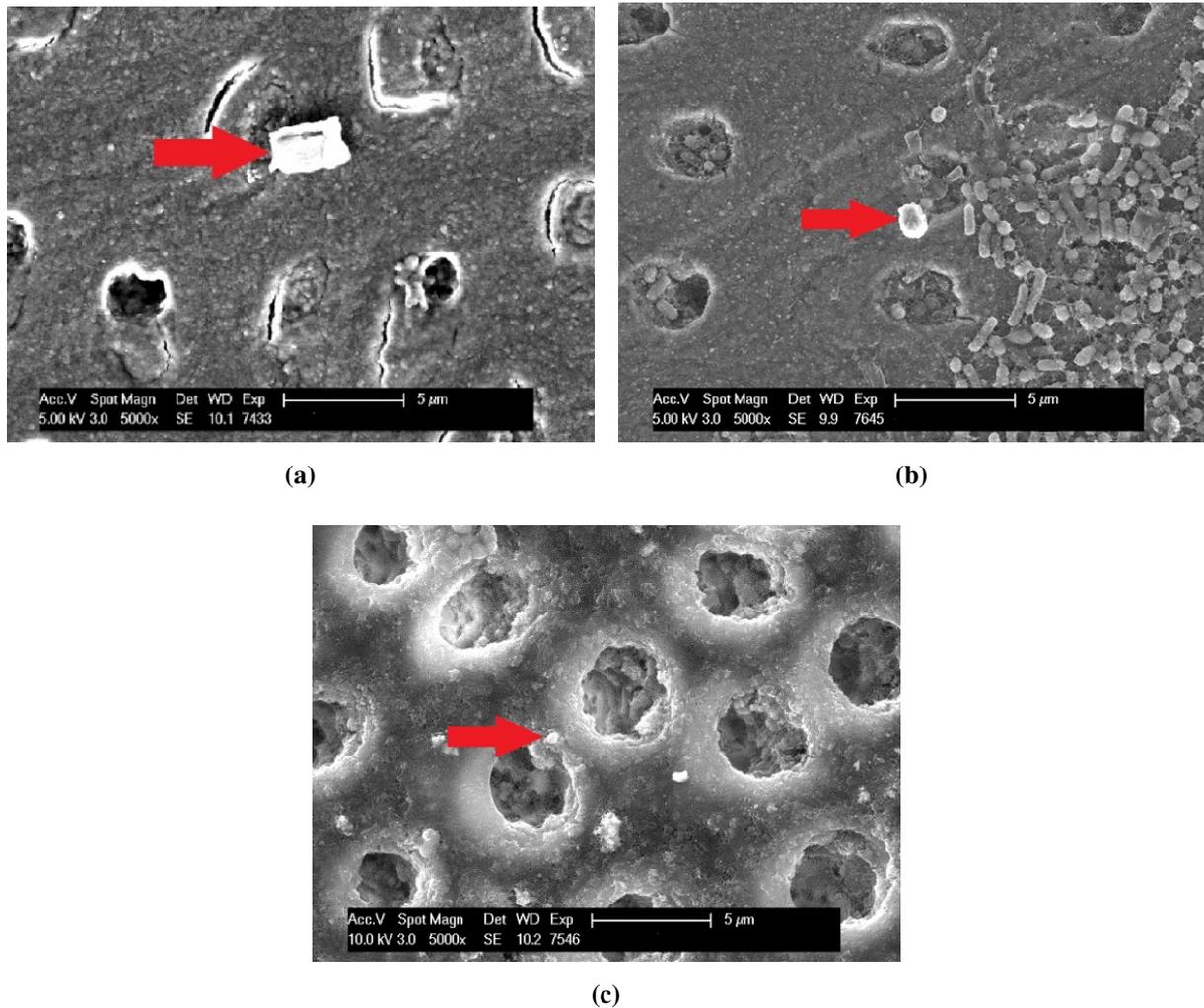


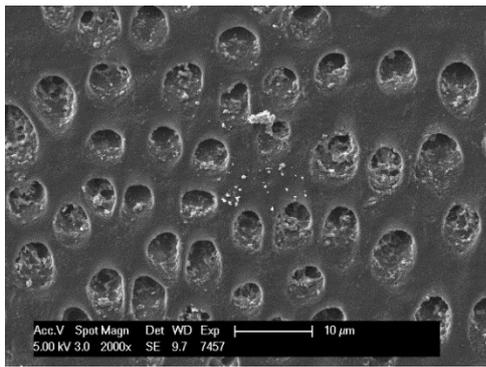
Abbildung 20: Darstellung der Siliziumdioxid-Putzkörper (Pfeil), die in EDX-Untersuchungen als solche verifiziert wurden (vergleiche Abbildung 24a + b; 25). (a) HA-P ungeputzt, poliert; (b) A-P ungeputzt, poliert; (c) A-P geputzt, geätzt (REM-Aufnahmen). Originalvergrößerung 5000-fach.

Die PK der HA-Reihe und die der CHX-Reihe wiesen von allen untersuchten Pasten die geringste Biofilmbildung auf. Auf den ungeputzten PK, die mit der H-P und der B-P in Berührung kamen, war die Biofilmneubildung im Vergleich zu der Versuchsreihe mit Wasser geringer, aber höher als bei den ungeputzten PK der HA-P und der CHX-P.

Die Ergebnisse der Versuchsreihe mit der A-P reihten sich zwischen denen der CHX-P und der B-P ein (Abb. 21).

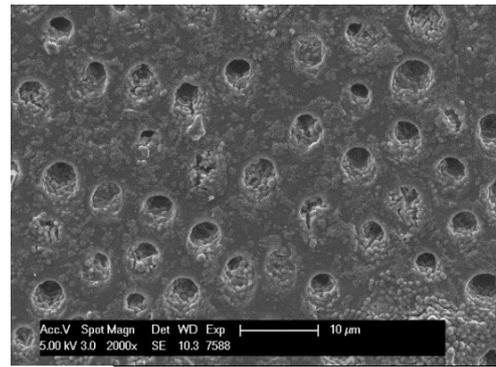
Die mit HA-P und CHX-P geputzten Dentin-PK wiesen die geringste Biofilmbildung auf. Die mit A-P geputzten PK zeigten eine geringfügig höhere Biofilmneubildung als die mit HA-P und CHX-P geputzten Proben. Die stärkste Biofilmneubildung trat auf den geputzten PK in den Versuchsreihen mit Wasser und H-P auf. Diese Daten stimmen in etwa mit den Ergebnissen der Fluoreszenzmikroskopie überein.

In Abbildung 21 sind repräsentative REM-Aufnahmen der getesteten Zahnpasten gegenübergestellt. Diese Abbildung soll die Wirkung der verschiedenen Inhaltsstoffe auf die Biofilmbildung verdeutlichen. Im Vergleich dazu sind in Abbildung 22 die Negativkontrolle mit Wasser und die PK der B-P im Vergleich dargestellt.

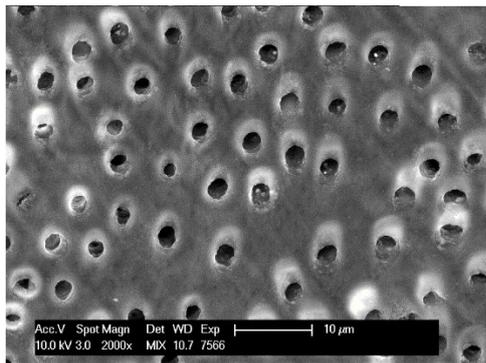


(a)

HA-P

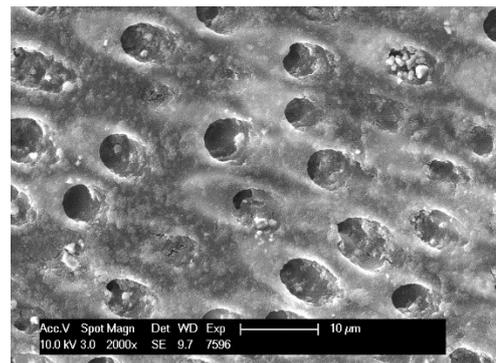


(b)

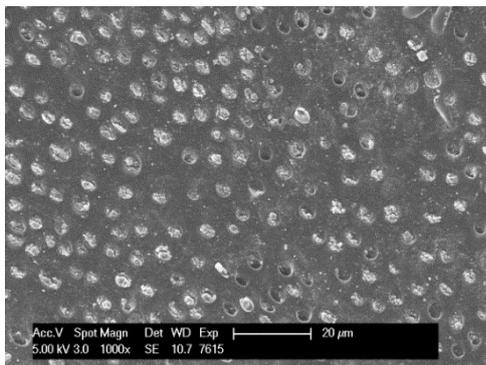


(c)

CHX-P

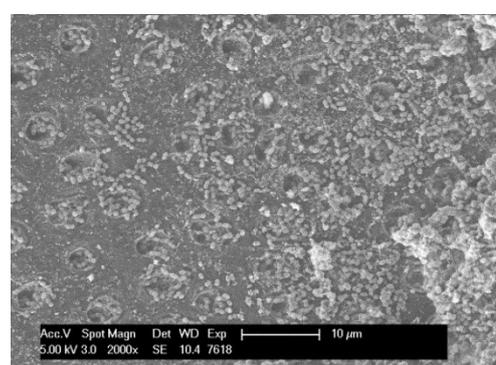


(d)

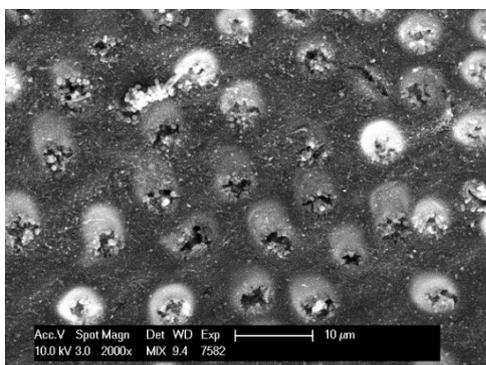


(e)

A-P

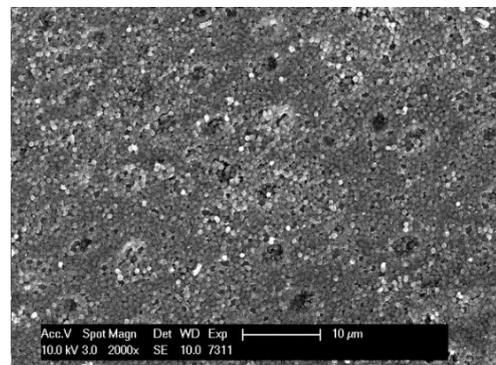


(f)



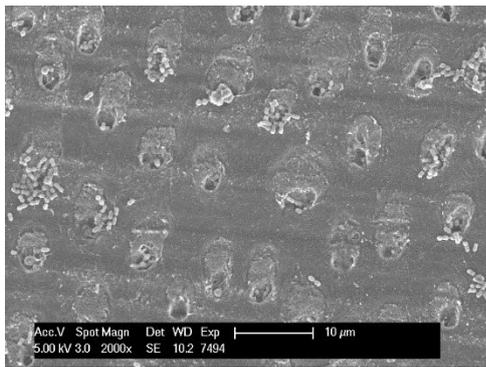
(g)

H-P

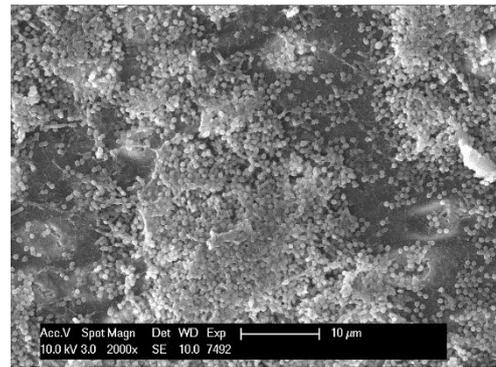


(h)

Abbildung 21: Gegenüberstellung der Biofilmbildung nach 24 h auf den geputzten (a, c, e, g) und ungeputzten PK (b, d, f, h) der getesteten Zahnpasten: (a + b) HA-P; (c + d) CHX-P; (e + f) A-P; (g + h) H-P (REM-Aufnahmen). Originalvergrößerung (a, b, c, d, f, g, h) 2000-fach, (e) 1000-fach.

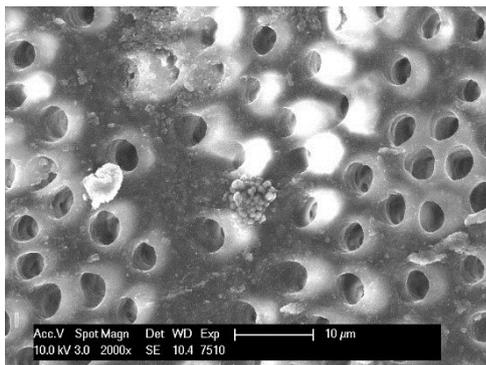


(a)

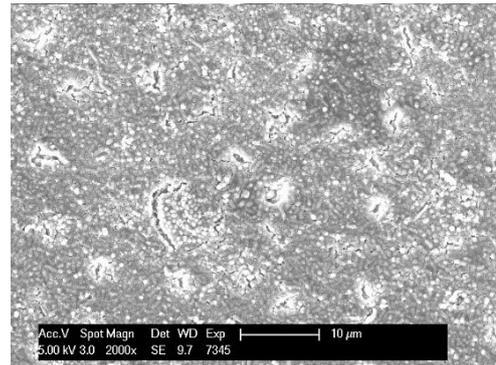


(b)

Wasser



(c)



(d)

B-P

Abbildung 22: Gegenüberstellung der Biofilmbildung nach 24 h auf den geputzten (a + c) und den ungeputzten PK (b + d) der Negativkontrolle Wasser und der Testpaste B-P: (a + b) Wasser; (c + d) B-P (REM-Aufnahmen). Originalvergrößerung 2000-fach.

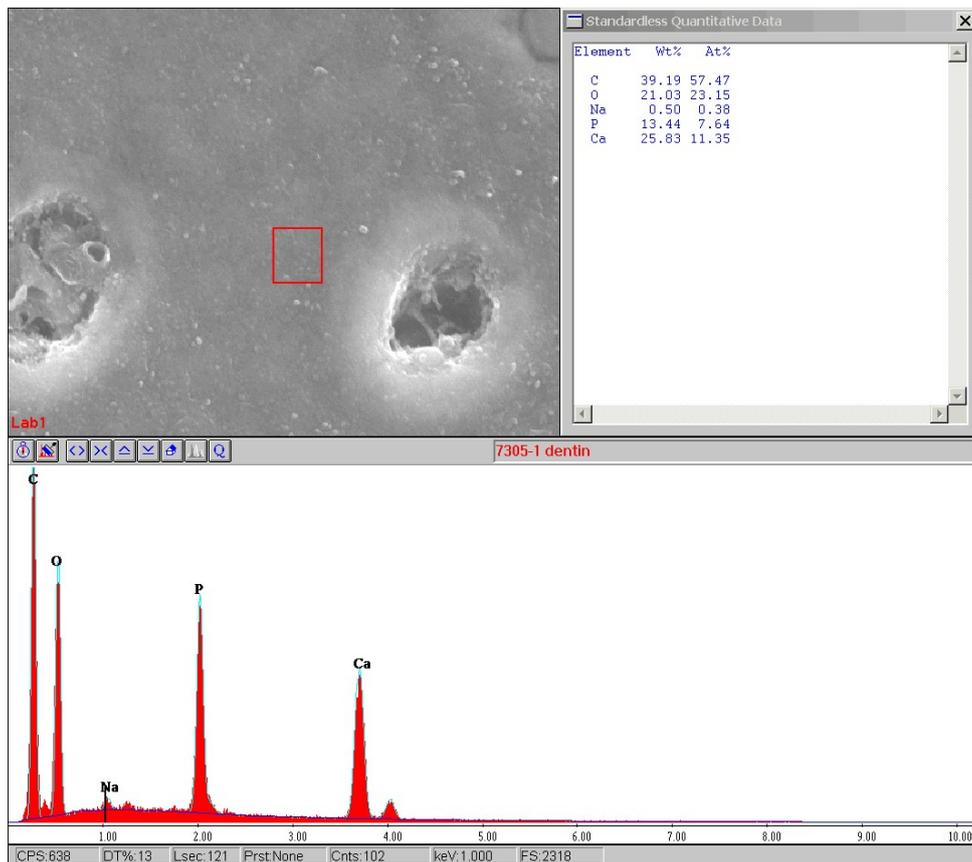
4.3 Analyse der Biofilme und der Zahnpastarückstände

Durch EDX-Untersuchungen wurden die im Biofilm und in den Zahnpastarückständen enthaltenen Elemente analysiert. Im Folgenden werden dabei nicht mehr die Unterschiede zwischen der geätzten und polierten Seite thematisiert, da diese in den vorangegangenen Kapiteln bereits beschrieben wurden. Als Referenzdaten wurden die PK die mit Wasser geputzt und gespült wurden analysiert. Zusätzlich dienten die Proben der B-P als Referenz, da die Paste ausschließlich die Grundinhaltsstoffe von allen getesteten Zahnpasten beinhaltet (s. Abb. 23). Die EDX-Analyse war vor allem bei den geputzten PK aussagekräftig, da dort die unterschiedlichen Zahnpastasubstanzen am besten nachzuweisen waren. Gelegentlich wurden diese Rückstände jedoch auch auf den ungeputzten PK nachgewiesen.

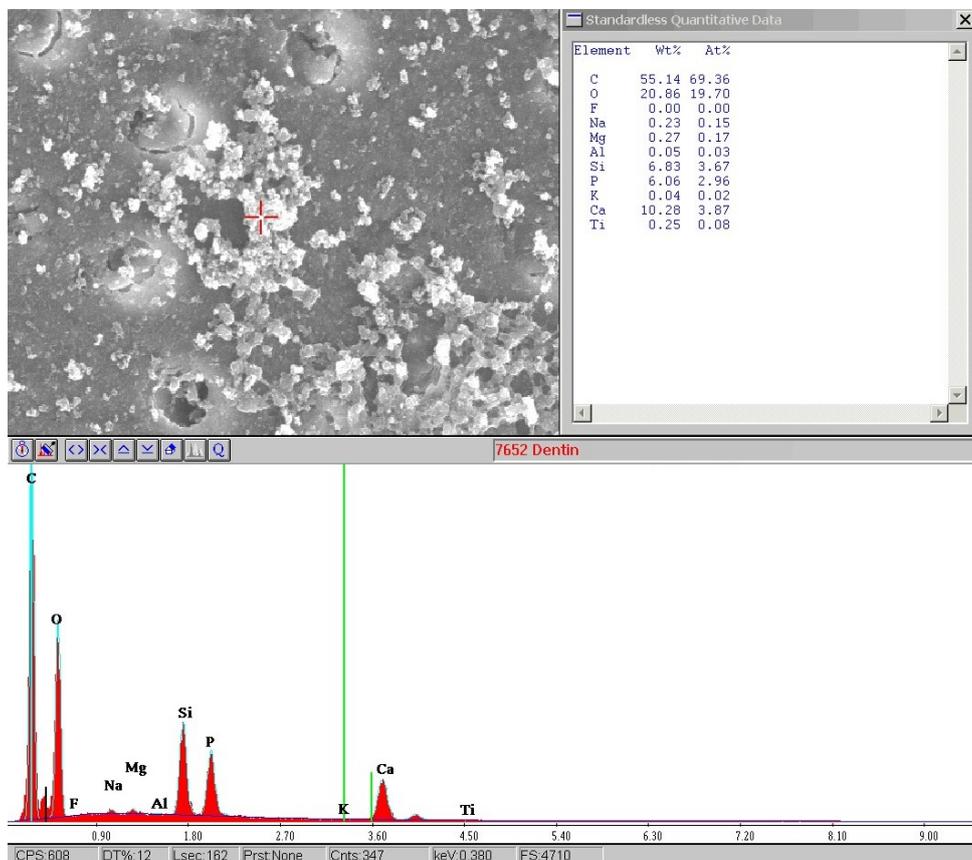
Bei den REM-Untersuchungen wurden auf den mit HA-P geputzten PK mit Zahnpastarückständen aufgefüllte Dentintubuli detektiert (Abb. 19). Die EDX-Analyse ergab, dass es sich bei diesen Rückständen in den Tubuli und auf der Dentinoberfläche überwiegend um HA handelte (s. Abb. 27, 28, 29). Abbildung 27 zeigt die aufgefüllten Dentintubuli und die entsprechende EDX-Analyse. In den Tubuli und auf der Dentinoberfläche waren Calcium und Phosphat die dominierenden Elemente. Auch auf den ungeputzten PK konnte HA nachgewiesen werden. Da bei diesen Ansätzen das Zahnpastagemisch lediglich die PK umspülte, ist von einer hohen Affinität des HA zur Dentinoberfläche auszugehen (s. Abb. 29).

Siliziumdioxid-Putzkörper traten auf allen geputzten und zum Teil auch auf den ungeputzten PK in unterschiedlicher Menge auf (s. Abb. 23b, 24, 25). Die meisten Siliziumdioxid-Putzkörper wurden auf den PK der Versuchsreihe HA-P und A-P mittels REM detektiert und durch die EDX-Analyse als solche verifiziert (s. Abb. 24, 25).

Auf den mit CHX-P geputzten PK konnten Al-Verbindungen deutlich nachgewiesen werden (s. Abb. 26). Auf der ungeputzten Seite dieser Versuchsreihe waren Al-Rückstände selten. Bei den Versuchen der HA-P und der A-P konnten geringere Mengen an Al nachgewiesen werden (s. Abb. 25).

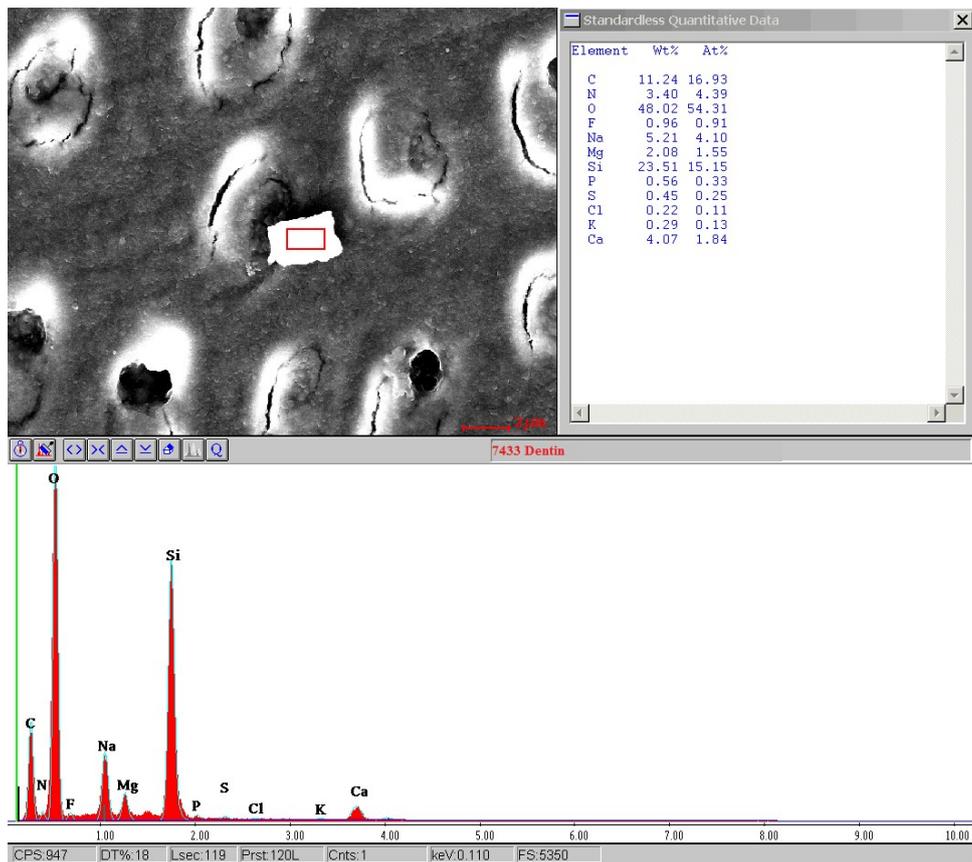


(a)

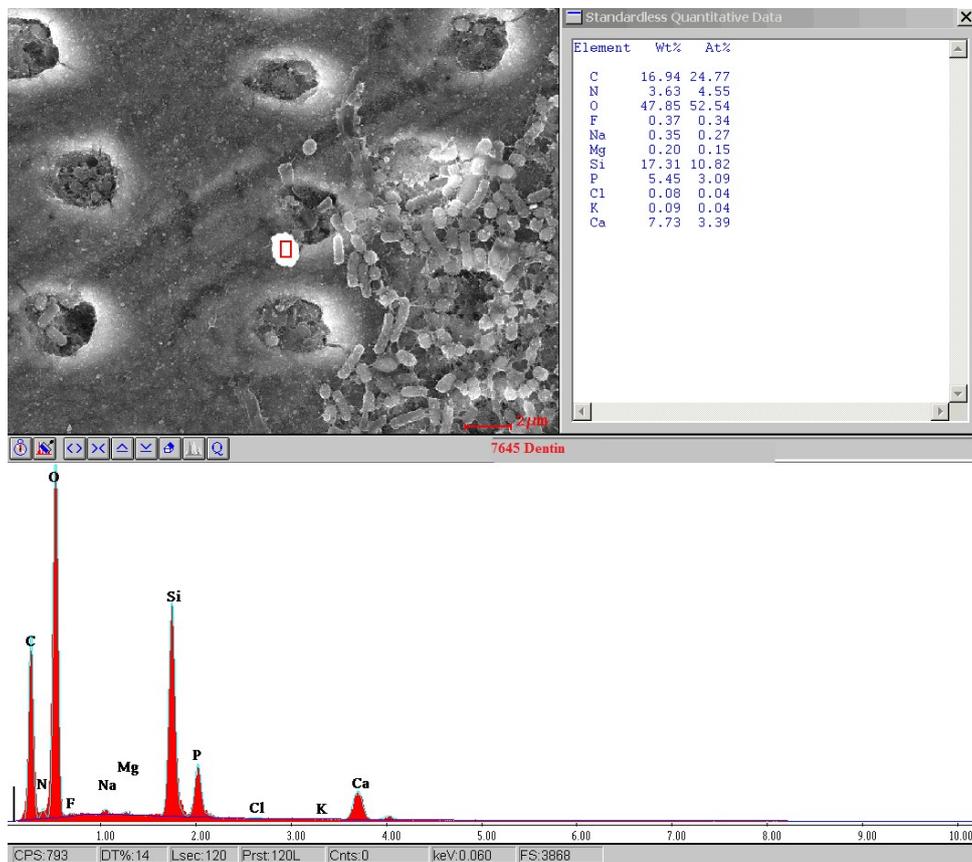


(b)

Abbildung 23: EDX-Aufnahmen der PK die mit Wasser und B-P geputzt wurden: (a) Wasser geputzt, Ausschnittsanalyse, (b) B-P geputzt, Punktanalyse. Das Si-Signal (b) lässt Siliziumdioxid-Putzkörper vermuten.

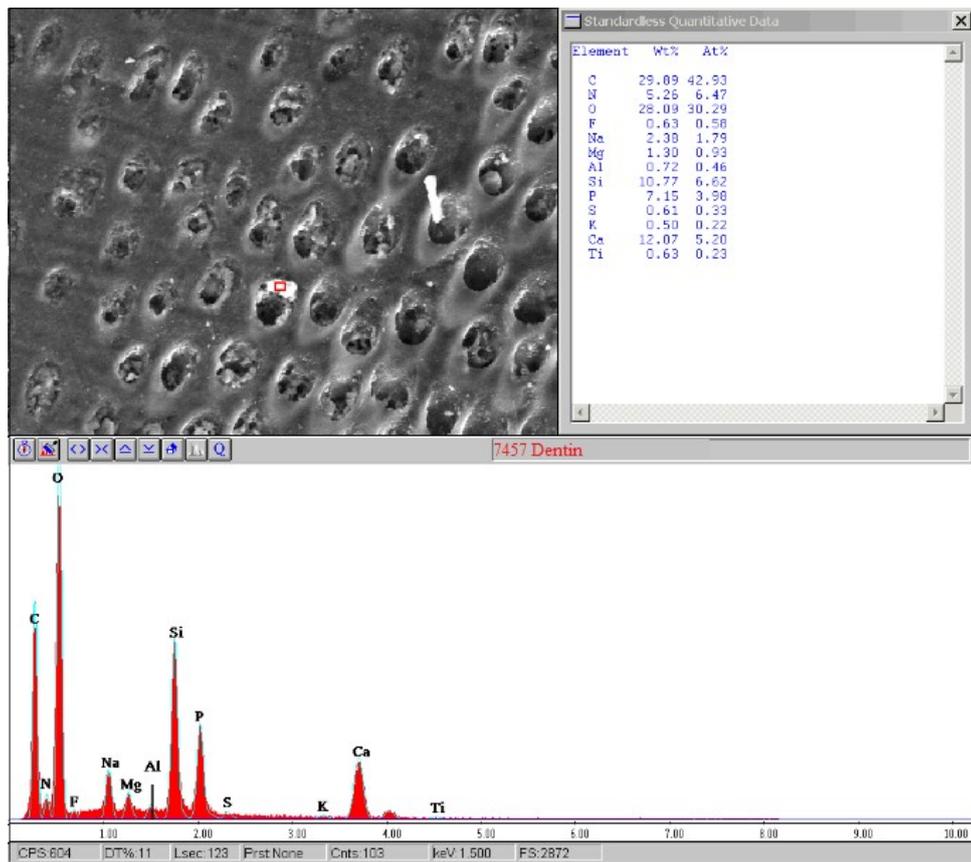


(a)

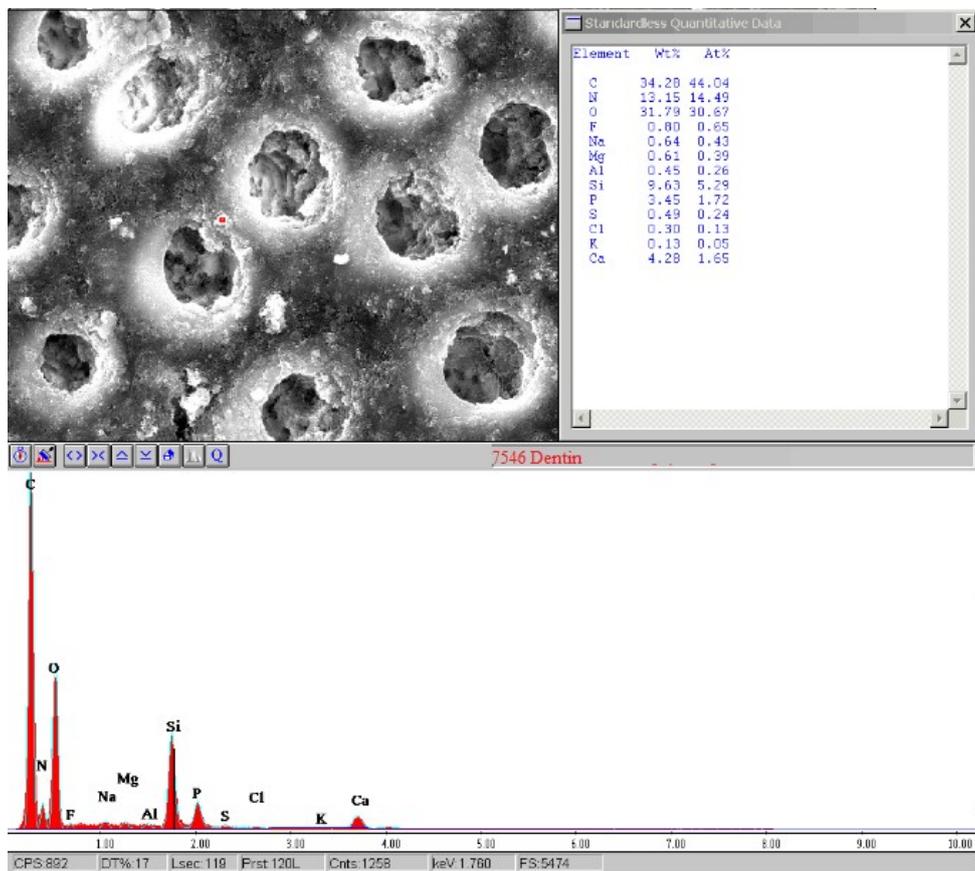


(b)

Abbildung 24: EDX-Aufnahmen (Punktanalyse) von ungeputzten Dentin-PK. (a) HA-P, (b) A-P. Siliziumdioxid-Putzkörper konnten in beiden Pasten detektiert werden. Die Putzkörper waren nicht nur auf den geputzten Dentinoberflächen (s. Abb. 25), sondern auch auf den ungeputzten PK nachweisbar.

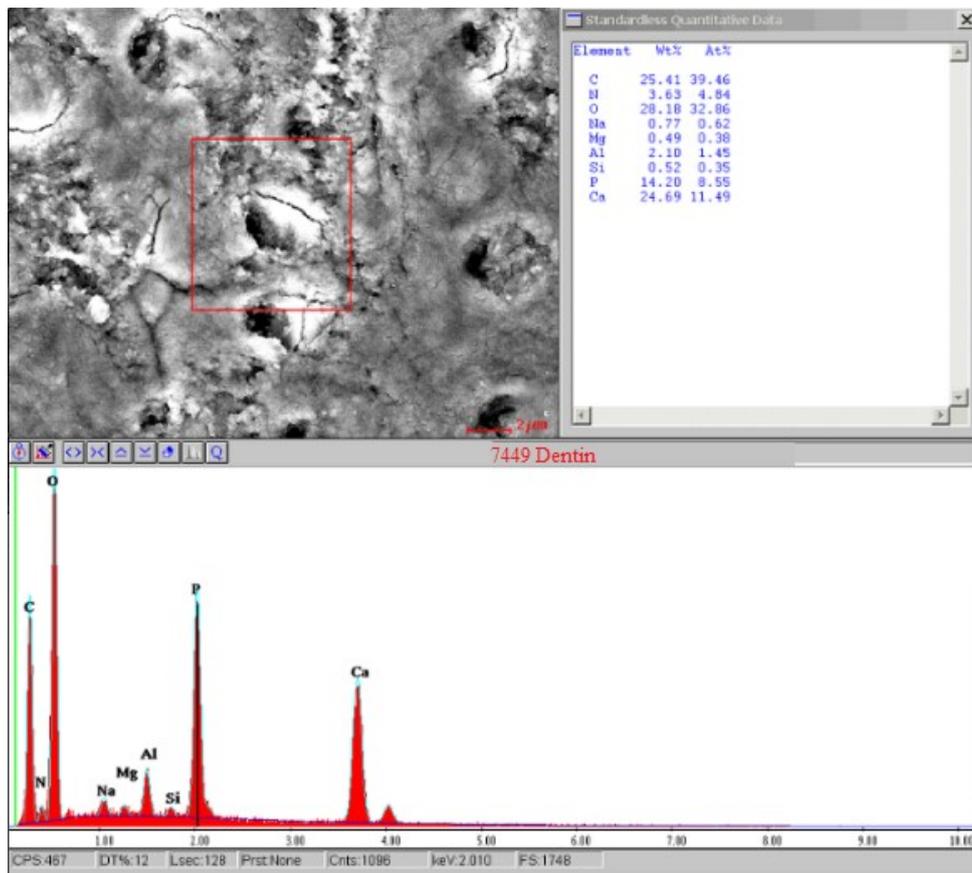


(a)

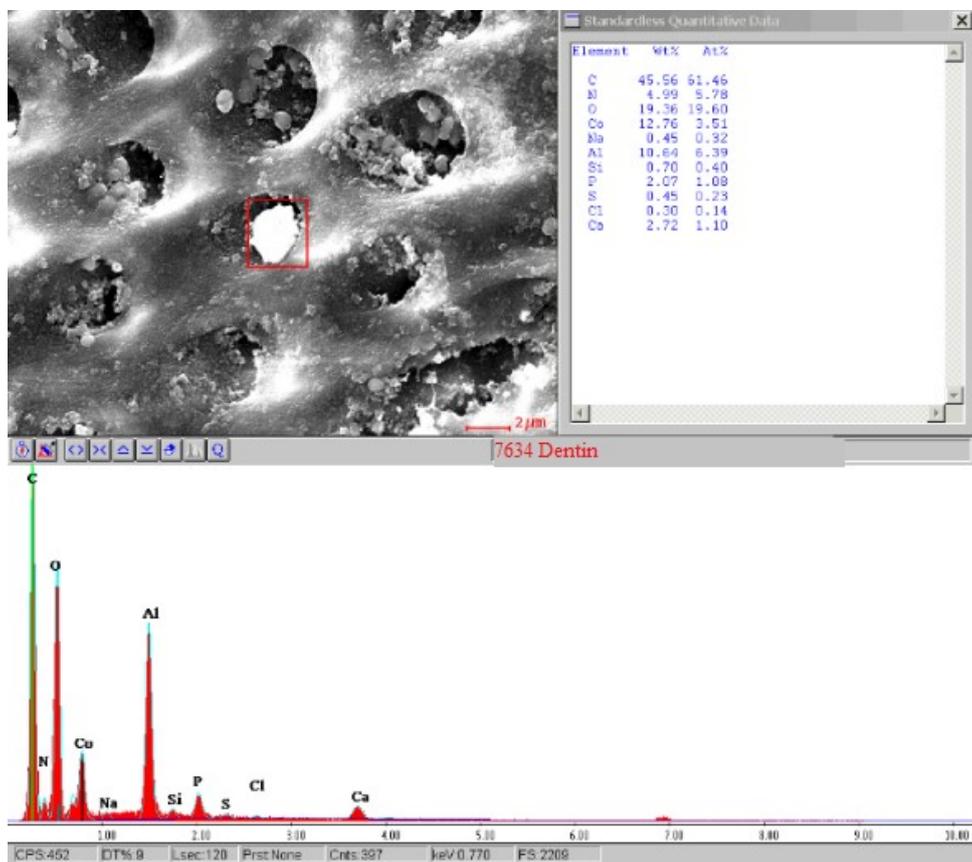


(b)

Abbildung 25: EDX-Aufnahmen von Siliziumdioxid-Putzkörpern auf der geputzten Dentinoberfläche, sowie in Zahnpastarückständen. Geringer Nachweis von Al auf den PK der HA-P und der A-P: (a) HA-P, (b) A-P.

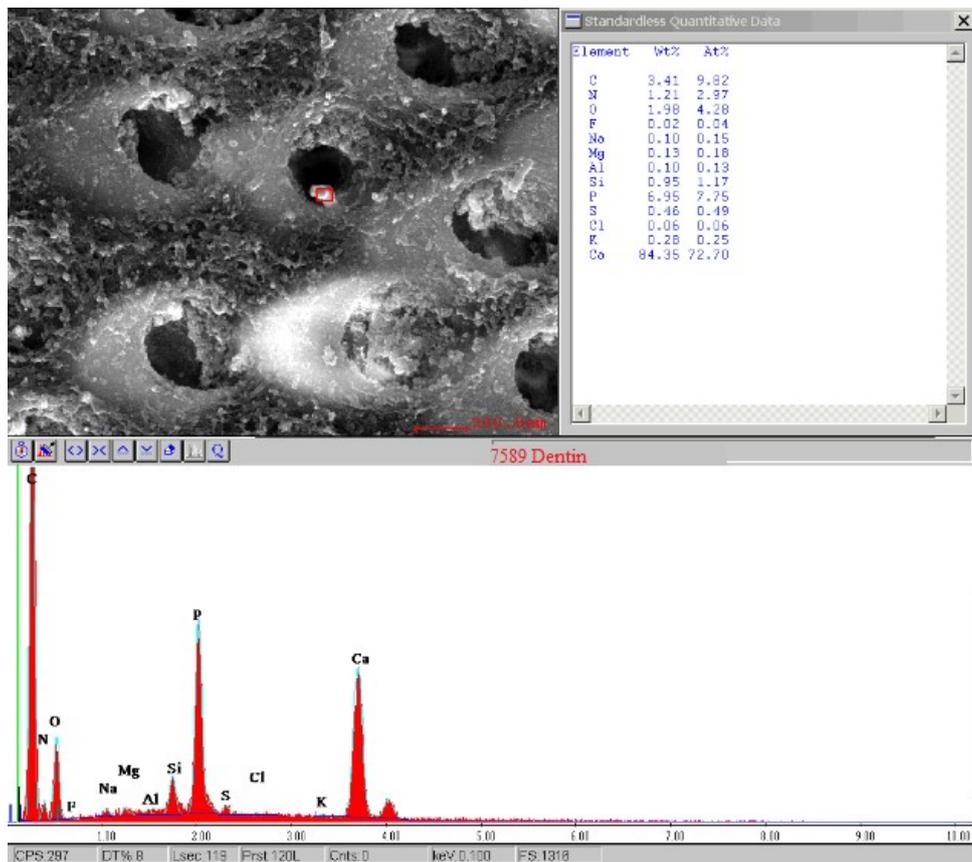


(a)



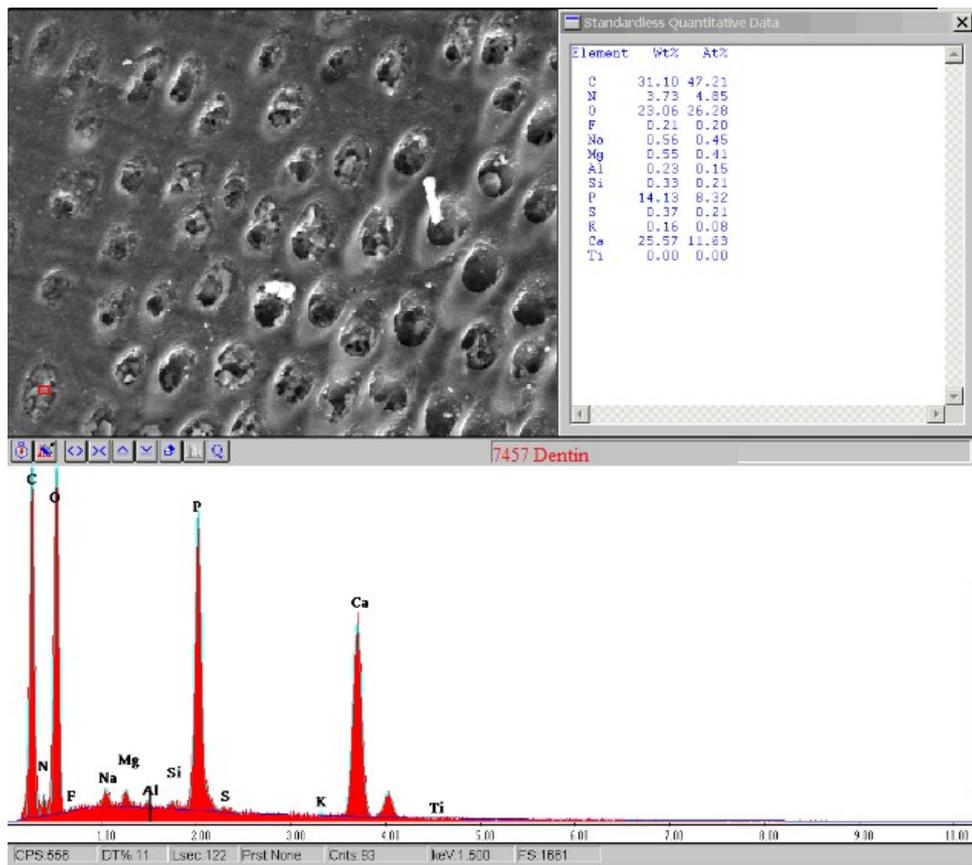
(b)

Abbildung 26: EDX-Aufnahmen von Dentin-PK, die mit der CHX-P geputzt wurden. Die Ausschnittsanalyse (a) und die Punktanalyse (b) dienen dem Nachweis von Al auf der Dentinoberfläche (hier a: 2,1 Gew.-%; b: 10,64 Gew.-%).

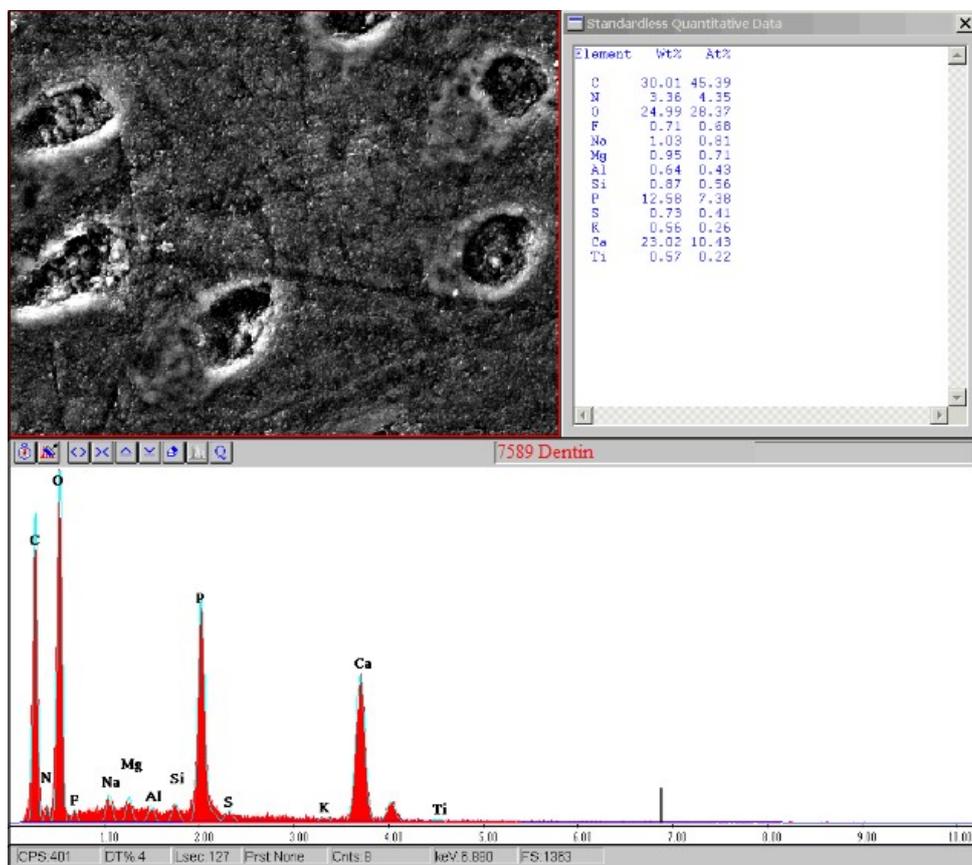


(a)

Abbildung 27: EDX-Analyse (Punktanalyse) eines Dentin-PK, der mit der HA-P geputzt wurde. In dieser Punktanalyse sind Calcium (hier 84,35 Gew.-%) und Phosphat (hier 6,95 Gew.-%) die dominierenden Elemente. HA konnte nicht nur in den Dentintubuli, sondern auch auf Pellikel bedeckter Oberfläche nachgewiesen werden (s. Abb. 29).

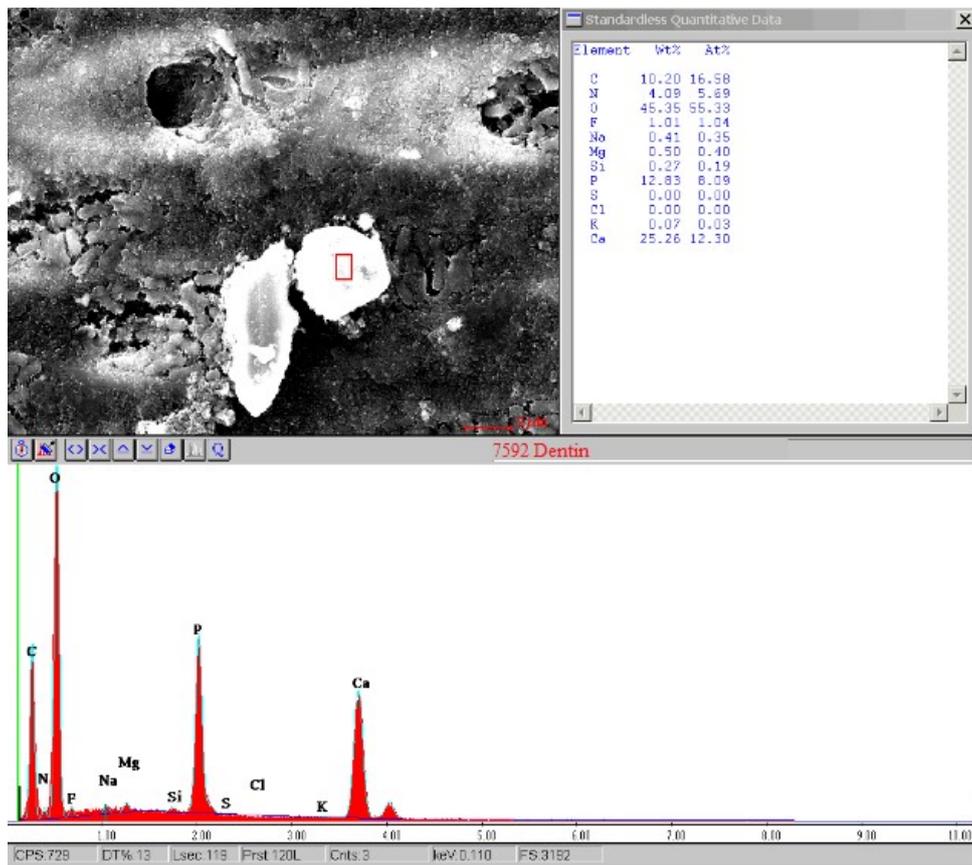


(a)

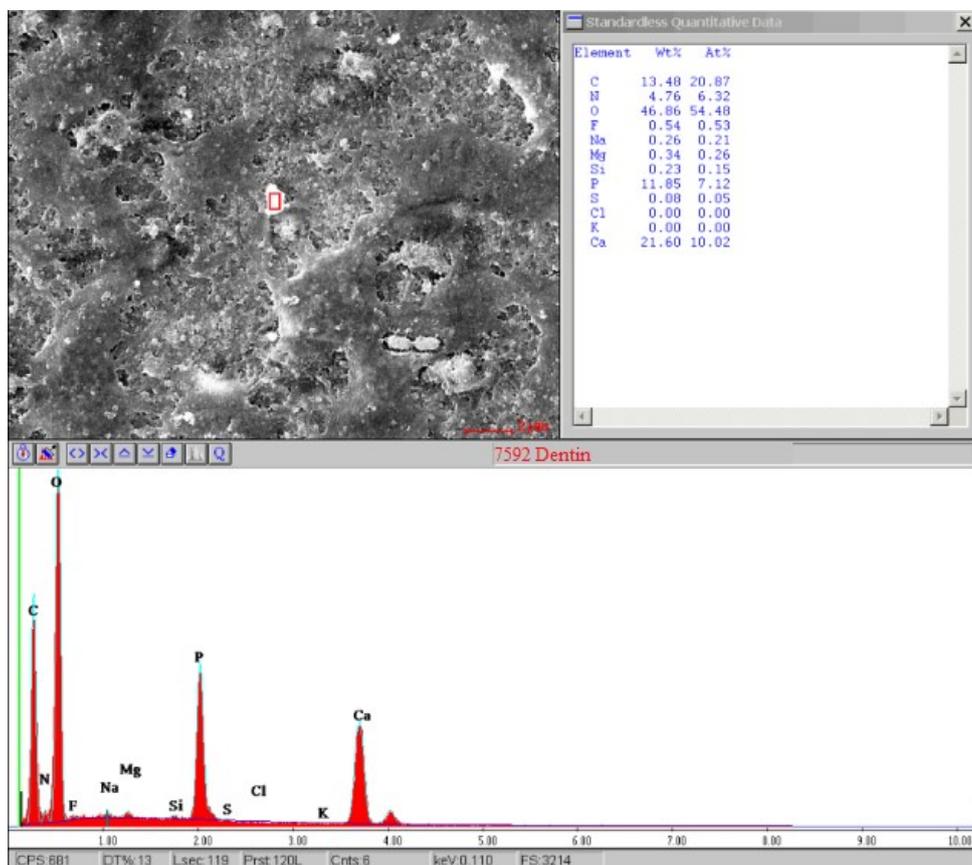


(b)

Abbildung 28: EDX-Analysen von mit HA-P geputzten PK. Elementanalyse der kompletten Dentineoberfläche zum Nachweis von HA (a + b). Auch hier können Calcium (a: 25,57 Gew.-%; b: 23,02 Gew.-%) und Phosphat (a: 14,13 Gew.-%; b: 12,58 Gew.-%) detektiert werden.



(a)



(b)

Abbildung 29: EDX-Analysen der ungeputzten Dentin-PK die mit der HA-P umspült wurden. Punktanalysen zum Nachweis von HA auf der ungeputzte Seite (a + b). Auch bei diesen PK sind Calcium (a: 25,26 Gew.-%; b: 21,6 Gew.-%) und Phosphat (a: 12,83 Gew.-%; b: 11,85) in vergleichbarer Menge detektierbar.

5 Diskussion

5.1 Methodik

5.1.1 Fragestellung und Studiendesign

Aufgrund seines breiten Einsatzspektrums und seiner Biokompatibilität wird HA in der Medizin und Zahnmedizin bei einer Vielzahl von Indikationen eingesetzt [Pepla et al., 2014]. Ein Ziel der präventiven Zahnheilkunde ist die Entwicklung von Verfahren zum Biofilmmanagement und zur Remineralisation von Initialläsionen, um die Entstehung von Karies zu verhindern [Hannig und Hannig, 2010b].

Dabei spielen HA-Kristalle unterschiedlicher Größe eine zentrale Rolle [Lelli et al., 2014]. Da HA der Hauptbestandteil der Knochen und Zähne ist, gehört es zu den am besten erforschten Biomaterialien. Als Calcium- und Phosphatlieferant kann HA durch eine Steigerung der Konzentrationen dieser Elemente in Speichel, Pellikel und Biofilm Demineralisationsprozesse entgegenwirken bzw. die Remineralisation fördern. Als Bestandteil von Zahnpasten zeigt es eine gute Bindefähigkeit an vorhandene Biofilme und Plaque. Dadurch sollen die kleinen HA-Kristalle kleinere Porositäten am Zahnschmelz auffüllen [Hannig und Hannig, 2010a].

Bei der Prävention von Karies spielt die Nanotechnologie eine große Rolle. Für die Remineralisation bzw. Reparatur kleiner Defekte oder Initialläsionen werden meist Nanopartikel benutzt, die die gleiche Größe wie natürliche HA-Kristalle im Schmelz (20 nm) und Dentin (100 nm) besitzen. *In vitro* Untersuchungen belegen, dass diese Nanopartikel gut an der angeätzten Schmelzoberfläche anhaften und folgende Demineralisationsprozesse verzögern. Die Reparatur von Initialläsionen beugt einer weiteren Demineralisation und somit Karies vor [Li et al., 2008]. Laut *in vitro* Studien adsorbieren nicht aggregierte bzw. gruppierte HA-Nanopartikel (100 nm x 10 nm x 5 nm) an die Bakterienoberfläche, wo sie eine weitere Bakterienadhärenz verhindern [Venegas et al., 2006].

Eine Studie suggeriert, dass Zahnpasten mit Nano-HA einen höheren remineralisierenden Effekt auf Schmelz und Dentin habe als vergleichbare fluoridhaltige Zahnpasten [Tschoppe et al., 2011]. Diese Untersuchungen sind als sehr kritisch zu betrachten, da Fluoride seit Jahren erfolgreich in der Kariesprävention eingesetzt werden. Die weiter bestehende Kariesinzidenz verlangt allerdings Ergänzungen oder auch Alternativen zu fluoridhaltigen Präparaten und dabei spielt HA eine wichtige Rolle.

Um den Einfluss von verschiedenen Wirkstoffen auf die Biofilmbildung zu erfassen, wurde in der vorliegenden Studie ein *in situ* Modell gewählt. Mit der Negativkontrolle Wasser und der Testpaste B-P (ohne antimikrobiellen Inhaltsstoffe) wurde der potentielle Effekt des Speichels abgebildet. Als Applikationsform wurde die Zahnpasta gewählt, da es die einfachste Methode darstellt und allen Probanden vertraut war. Somit konnten Anwendungsfehler minimiert werden.

Die systematischen Untersuchungen wurden neben der Negativkontrolle mit Wasser mit fünf unterschiedlichen Zahnpasten durchgeführt.

Die in der Versuchsreihe verwendete HA-Paste beinhaltete neben den Bestandteilen der B-P Al-Lactat, 1360 ppm Na-Fluorid und 8 %iges HA. Als ideale Vergleichspaste diente die A-P, die bis auf HA die gleichen Wirkstoffe enthielt. Als weitere Vergleichspasten wurden eine CHX-haltige (CHX-P) und Kräuterextrakt-haltige (H-P) verwendet. Die H-P enthielt die geringste Menge an Fluorid (s. Tab. 1).

5.1.2 Herstellung und Verwendung der bovinen Prüfkörper

Rinderzähne unterscheiden sich strukturell und in ihrer chemischen Zusammensetzung (Calcium, Phosphor, Magnesium) nicht wesentlich von humanen Zähnen [Esser et al., 1998]. Durch ihre ausreichende Verfügbarkeit und Größe eignen sie sich gut für die Herstellung der PK. Da in der vorliegenden Untersuchung PK mit einer geätzten und polierten Seite verwendet werden sollten, war eine ausreichende Größe (4 - 5 mm x 4 - 5 mm x 1 - 1,5 mm) erforderlich. Bei der Verwendung von humanen PK hätten daher deutlich mehr kariesfreie Zähne extrahiert werden müssen. Auch die Homogenität und Kariesfreiheit der Rinderzähne spielten bei der Wahl der PK eine wichtige Rolle. Bei der Verwendung von bovinen PK muss jedoch berücksichtigt werden, dass Rinder eine porösere Zahnhartsubstanz haben als Menschen. Die damit verbundene höhere Diffusionsrate begünstigt die Kariesentstehung [Featherstone und Mellberg, 1981]. Auch die Größe der Apatitkristalle und die interprismatische Substanz weichen von den humanen Präparaten ab [Oesterle et al., 1998].

Für eine größtmögliche Vergleichbarkeit wurden die 120 Dentin-PK aus kariesfreien Frontzähnen von zweijährigen Rindern aus einem Schlachthof gefertigt. Die einheitliche Ernährung der Rinder führt zu einer vergleichbaren mineralischen Zusammensetzung des Rinderzahnes.

REM-Untersuchungen belegen, dass die initiale Biofilmbildung an Oberflächenunebenheiten, beginnt. An diesen Stellen sind die Scherkräfte geringer, die eine Anheftung der Bakterien erschweren [Quirynen und Bollen, 1995, McConnell et al., 2010]. Für eine glatte, gleichmäßige

Oberfläche wurden die Dentin-PK mit Nassschleifpapier in aufsteigender Korngröße poliert. Anders als PK aus Glas weisen bovine PK in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen eine Eigenfluoreszenz auf (Abb. 7).

Daher ist eine computergestützte Auswertung der Proben nur eingeschränkt möglich. Glas-PK sind jedoch den bovinen PK als Modell für physiologische Adhäsionsprozesse unterlegen.

5.1.3 Probandenauswahl

An der vorliegenden Studie nahmen fünf Probanden teil. Da bestimmte Erkrankungen und Medikamente Auswirkungen auf die Speichelflussrate und -zusammensetzung [Bergdahl und Bergdahl, 2000, Leal et al., 2010] und somit auf die Biofilmbildung haben, wurden diese über eine Anamnese ausgeschlossen. Weiter wurden nur Probanden mit kariesinaktivem Gebiss, unauffälligen Schleimhautbefunden und parodontal unversehrten Zähnen zugelassen. Um die Verfälschung der Ergebnisse durch Nahrungsbestandteile zu verhindern, wurden die Probanden angehalten, beim Essen die Schienen zu entfernen und während der Tragezeit nur Wasser zu trinken. Alkohol, Zigarettenkonsum und die Verwendung von Mundspüllösungen wurden untersagt. Die Schienen wurden jeweils 24 h ab 8 Uhr morgens (Vereinheitlichung des zirkadianen Rhythmus) getragen. Für das Putzen der Schienen nach 30 min, 12 h und 23,5 h erhielten die Probanden eine einheitliche Zahnbürste. Für die Versuchsreihen mit den verschiedenen Testpasten wurde jeweils eine neue Zahnbürste verwendet.

5.1.4 Biofilmgewinnung

Der Wissenschaft stehen *in situ* und *in vitro* Modelle zur Analyse von dentalen Biofilmen zur Verfügung. Mit *in vitro* Biofilmmodellen können die Wirkung von antimikrobiellen Inhaltsstoffen, die Mechanismen der Biofilmbildung sowie Resistenzentwicklungen im dentalen Biofilm unter Laborbedingungen erforscht werden. Der Vorteil dabei ist, dass die Versuche reproduzierbar und wiederholbar sind und keine individuellen Gegebenheiten auf die Versuchsreihen einwirken. Dies erlaubt eine objektive Auswertung der Ergebnisse und eine Anpassung der Untersuchungsparameter nach Bedarf [Wimpenny, 1982]. *In vitro* Modelle sind das Mittel der Wahl zur Verträglichkeitsanalyse kritischer Substanzen.

Für die *in vitro* Biofilmgewinnung haben sich zwei Verfahren etabliert. Das „*flow displacement biofilm model*“ ist ein offenes, dynamisches System mit einem ständigen Austausch von verbrauchtem und frischem Wachstumsmedium. Durch diese Scherbewegungen werden Biofilme

gebildet. In dem „*mikrotiter plate-based model*“ wächst der Biofilm statisch auf Kunststoffoberflächen innerhalb eines geschlossenen Systems. Dabei können unterschiedliche Parameter gleichzeitig mit wenig Aufwand erforscht werden [Coenye und Nelis, 2010].

Nach erfolgreichen *in vitro* Versuchen schließen sich meist klinische *in situ* Modelle an, da zwischen der Bioadhäsion *in vivo* und *in vitro* große Differenzen auftreten [Tawakoli et al., 2013].

Für die intraorale Biofilmgewinnung eignen sich beispielsweise Zähne, die aus kieferorthopädischen Gründen extrahiert werden müssen [Al-Mulla et al., 2010]. Einschränkungen ergeben sich daraus, dass bei der Extraktion die Zunge einen Teil des Biofilms zerstört. Eine weitere Möglichkeit ist die Befestigung von PK an kieferorthopädischen Brackets [Meyerowitz et al., 1991] oder an herausnehmbaren Schienensysteme und Teilprothesen [Laheij et al., 2010]. Durch die Verwendung von Trägermaterialien bleibt die Struktur des Biofilms bei der Entnahme der PK erhalten.

Für die vorliegenden Versuche wurden die PK auf dünne, herausnehmbare Kunststoffschienen montiert. Die Probanden konnten ihre Mundhygiene wie gewohnt durchführen. Durch den hohen Tragekomfort wurde eine gute Compliance bei den Probanden erreicht. Die bovinen Dentin-PK wurden auf den Trageschienen in ein A-Silikon eingebettet und ringsherum umschlossen, um Scherbewegungen durch die Wange und das Umspülen der PK mit Speichel zu minimieren. Durch das Silikon konnten die Proben nach der Tragezeit von den Miniplast-Schienen abgenommen werden, ohne den Biofilm zu beschädigen.

Ein Nachteil solcher *in situ* Modelle ist die fehlende Reproduzierbarkeit. Obwohl die Probanden angehalten wurden, das Putzprotokoll und die Tragezeit der Schiene genau einzuhalten, ist eine unterschiedliche Handhabung durch die Probanden nicht auszuschließen.

Optimal wäre es, den Biofilm direkt aus dem Mund vom natürlichen Zahn zu entnehmen bzw. direkt im Mund zu untersuchen. Die toxischen Materialien und die eingeschränkten Platzverhältnisse in der Mundhöhle machen ein solches Vorgehen jedoch unmöglich [Robinson et al., 1997].

5.1.5 Untersuchung des Biofilms

Fluoreszenzmikroskopie (*live-dead-staining*)

Die Fluoreszenzmikroskopie diente in der vorliegenden Dissertation der Visualisierung von vitalen und avitalen Bakterien [Hannig und Hannig, 2007]. Ein Vorteil dieser Untersuchungsmethode ist, dass die PK ohne aufwendige Vorbereitung direkt analysiert werden können [Arweiler et al., 2002]. Allerdings erlaubt das Verfahren nur die Differenzierung von vitalen / avitalen Bakterien und von Stäbchen / Kokken. Eine genaue Analyse oberflächlicher und tiefer Plaqueschichten und eine Bestimmung der Bakterienspezies ist nicht möglich [Arweiler et al., 2002]. In der vorliegenden Studie wurde das BacLight Bacterial Viability Kit benutzt. Beide darin enthaltenen Farbstoffe (Propidiumiodid, Syto 9 green) lagern sich in doppelsträngige DNA ein. Das grün fluoreszierende Syto 9 färbt lebende und tote Zellen, während das rot fluoreszierende Propidiumiodid nur Zellen mit geschädigter Membran markiert. Wenn es in die Zelle eindringt verdrängt es Syto 9 green. Daher präsentieren sich vitale Bakterien unter dem Fluoreszenzmikroskop grün, und avitale Bakterien rot [Berney et al., 2007, Boulos et al., 1999].

Als Nachteil der Methode wird der Effekt beschrieben, dass mit steigender Belichtungszeit grün fluoreszierende Zellen instabil werden und ihre Lebensfähigkeit verlieren, wodurch die ursprüngliche Vitalität der Bakterien im Biofilm falsch eingeschätzt werden kann [Netuschil et al., 2014]. Die Auswertung der PK sollte daher nach der Färbung nicht länger als 10 min dauern. Bei der Betrachtung der PK und bei der Analyse der Ergebnisse musste eine gewisse Eigenfluoreszenz der Zahnpasta berücksichtigt und miteinbezogen werden.

5.1.6 Scoring der Biofilmmenge und Vitalität der Bakterien

In der vorliegenden Studie wurde ein Scoring für die Biofilmbedeckung und für die Vitalität der Bakterien erstellt (Abb. 5 und 6). Eine Auszählung von einzelnen Bakterien auf den PK war nicht durchführbar, da die ungeputzten PK teilweise dreidimensionale Bakterienkolonien oder einen mehrschichtig organisierten, die komplette Oberfläche bedeckenden Biofilm aufwiesen. Auch die Eigenfluoreszenz der Dentintubuli macht eine computergestützte Auswertung unmöglich. Vor allem in geätzten PK waren in den Dentintubuli mit der REM adhärenente Bakterien nachweisbar, die fluoreszenzmikroskopisch nicht im Detail erfasst werden konnten.

5.1.7 REM / EDX

Für eine ergänzende morphologische Beschreibung des Biofilms wurde die REM genutzt. Dieses Verfahren ermöglicht eine detaillierte Aufnahme der PK und der Dentintubuli bis zu einer 200.000-fachen Vergrößerung. Die komplexen und zeitaufwändigen Vorbereitungsmaßnahmen der PK (z.B. Fixierung, Dehydrierung) und Schwierigkeiten bei der Bestimmung der Bakterienspezies werden als Gründe genannt, die REM nicht als alleinige Methode zur Untersuchung von Biofilmen zu verwenden [Hannig et al., 2010]. Auch eine Unterscheidung zwischen vitalen und avitalen Bakterien ist nicht möglich.

Zusätzlich zur morphologischen Beschreibung durch das REM wurden EDX-Analysen des Biofilms und der Zahnpastabestandteile durchgeführt. Neben Punktanalysen ausgewählter Areale wurden auch Analysen der gesamten Bildoberfläche erhoben. Über Punktanalysen konnten beispielsweise Rückstände in den Tubuli erfasst werden.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Die Unterschiede zwischen den Probanden bei der Biofilmmenge und in der Vitalität der Bakterien können durch individuelle Faktoren wie Speichelmenge- und -zusammensetzung, sowie durch unterschiedliche Nahrungsgewohnheiten bedingt sein. Auch eine variable Compliance der Testpersonen kann die Ergebnisse beeinflussen.

In der vorliegenden Studie wurden bei jeder Versuchsreihe die geputzten PK den ungeputzten gegenübergestellt. Die mechanisch gereinigten PK wiesen bei jeder Versuchsreihe eine Biofilmreduktion auf der Dentinoberfläche auf. Dies verdeutlicht die Wirksamkeit des alleinigen Putzens mit und ohne Zahnpasta.

In der vorliegenden Studie wurde eine Negativkontrolle (Wasser) verwendet. Die Negativkontrolle mit Wasser zeigte im Vergleich zu den Ansätzen mit B-P mit und ohne mechanische Reinigung eine ausgedehntere Biofilmbedeckung und eine erhöhte Vitalität der Mikroorganismen im Biofilm. Diese Befunde verdeutlichen die Wirksamkeit der Grundinhaltsstoffe der getesteten B-P im Vergleich zu Wasser. Vergleicht man jedoch die Ergebnisse der B-P mit denen der HA-P, CHX-P und A-P war die B-P und die H-P jedoch weniger effektiv, wodurch der Effekt von HA, CHX und Al auf die Biofilmneubildung und die Vitalität der Bakterien im Biofilm hervorgehoben wird. Bei dieser Betrachtung der Ergebnisse muss jedoch berücksichtigt werden, dass die HA-P und die A-P vermehrt Putzkörper in Form von Siliziumdioxid beinhalten, was zu einer Verstärkung der mechanischen Reinigung der Dentinoberfläche beitragen kann.

Dieses Phänomen verdeutlicht, dass nicht jede Zahnpasta die Biofilmreduktion in gleicher Weise unterstützt und daher noch weitere Untersuchungen erforderlich sind um diese Frage eindeutig zu klären. Welchen Anteil die jeweiligen Wirkstoffe und die mechanische Reinigung an der Reduktion der Biofilmneubildung haben ist durch die Studie jedoch nicht eindeutig zu beweisen. Es fehlen auch klinische Untersuchungen die belegen, dass Karies alleine durch mechanische Entfernung des Biofilms verhindert werden kann [Geurtsen et al., 2016].

Weiterhin wurde bei den Versuchen zwischen einer geätzten und polierten Dentinoberfläche unterschieden, da sich die Oberflächenbeschaffenheit auf die Biofilmadhäsion auswirken kann [Hannig und Hannig, 2009, McConnell et al., 2010]. Rauhe Oberflächen, wie z. B. initiale Kariesläsionen, sind ungünstiger zu Reinigen als polierte, glatte Oberflächen und es lagern sich dort vermehrt Bakterien an [Bollen et al., 1997]. Dieses Phänomen zeigte sich auch in der vorliegenden Studie. Putzen auf poliertem Dentin führt zu einer signifikanten Reduktion der Biofilmneubildung im Vergleich zur geätzten Oberfläche. Nach 24-stündiger Biofilmbildung, ohne mechanische Reinigung, ist jedoch kein signifikanter Unterschied mehr zwischen geätzter und polierter Oberfläche erkennbar. Dies verdeutlicht, dass Biofilme nach 24 h den Effekt einer polierten Dentinoberfläche überwinden.

In den Dentintubuli wurden vermehrt Biofilmaggregationen sowie Zahnpastarückstände gefunden. Dies trat besonders auf der geätzten Seite der PK auf, da Pellikel sich primär an Oberflächenunebenheiten ausbilden [Hannig und Hannig, 2009, McConnell et al., 2010]. Eine Oberflächenrauigkeit von mehr als $0,2\ \mu\text{m}$ ist für eine bakterielle Besiedelung besonders vorteilhaft [Bollen et al., 1997]. Die Dentinkanälchen schützen die Mikroorganismen vor Scherkräften und bieten eine günstige Umgebung für das Wachstum des Biofilms.

Im Vergleich zu humanen Präparaten besitzt bovines Dentin bei insgesamt größeren Tubuli eine geringere Tubulusdichte. Dies sollte bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden [Jung et al., 2010].

REM-Analysen der Kontroll-PK, die nur mit Wasser in Berührung kamen, zeigen die Morphologie der initialen Pellikel auf der Dentinoberfläche. Bei einigen Aufnahmen war zu erkennen, wie sich kleinere Partikel den Bakterien anlagern (Abb. 17e). Das abgebildete Stadium entspricht daher einer Reifung zur dentalen Plaque [Hannig und Joiner, 2006].

Bei der Biofilmvitalität sind bei einigen PK Veränderungen zu erkennen, jedoch muss hier die Eigenfluoreszenz der Zahnpasta berücksichtigt werden. Die Ergebnisse könne dadurch beeinflusst werden und müssen dahingegen abgewägt werden. Hier besteht auch nach dieser Studie weiterer Forschungsbedarf da die antimikrobiellen Substanzen wirksam sein sollen jedoch auch zu keiner Schädigung des umliegenden Gewebes führen dürfen.

Die vorliegenden REM- und fluoreszenzmikroskopischen Befunde zeigen, dass der inhibitorische Effekte auf die Biofilmneubildung bei der HA-P und CHX-P vergleichbar waren. Diese Ergebnisse entsprechen den Resultaten einer vorangegangenen Studie mit einem bovinen Schmelzmodell [Hannig et al., 2013].

Bei den HA-P-Ansätzen konnte auf den geputzten und ungeputzten PK im live-dead-staining und im REM eine verminderte Biofilmneubildung im Vergleich zu den anderen Zahnpasten nachgewiesen werden. Einen inhibitorischen Effekt des HA auf die Biofilmneubildung zeigte ebenfalls eine Studie mit BioRepair [Hannig et al., 2013]. In einer *in vitro* Studie wurde außerdem gezeigt, dass HA-Nanopartikel mit der bakteriellen Zellmembran interagieren [Venegas et al., 2006]. Vermutlich kompetieren die Adhäsine der bakteriellen Zellmembran und die Nanopartikel um die gleichen Bindungspartner, was die Anheftung von Bakterien auf den initialen Biofilm verzögert. Dieser Effekt wurde schon für andere Nanomaterialien beschrieben [Rose, 2000].

In den REM-Aufnahmen waren bei den Versuchen mit der HA-P globuläre Strukturen auf der Dentinoberfläche und in den Tubuli zu erkennen. Diese Aufnahmen zeigen, dass die Kanälchen mit dem Zahnpastagemisch und den darin enthaltenen Nano-HA-Kristalle aufgefüllt wurden (Abb. 19). Die Strukturen beruhen nicht auf das Vorhandensein von Parotisproteinen, da diese eine andere Größe besitzen [Hannig und Joiner, 2006]. Laut EDX-Analysen handelte es sich bei diesen Strukturen um Nano-HA-Kristalle, die der Zahnpasta als Wirkstoffe beigefügt waren (Abb. 27, 28, 29). Auf Grund dieses Phänomens wird in vielen Studien suggeriert, dass HA zur Behandlung von schmerzempfindlichen Zähnen und zur Remineralisation der Zahnhartsubstanz eingesetzt werden kann [Tschoppe et al., 2011]. Die HA-Nanopartikel in den Zahnpasten haben die gleiche Größe wie HA-Partikel in der humanen Zahnhartsubstanz. Daher wird suggeriert, dass diese Nanopartikel kleinere Läsionen am Zahn auffüllen können [Hannig und Hannig, 2010a]. Das Bedecken der Dentinkanälchen spricht für einen remineralisierenden und karieshemmenden Effekt von HA, der schon in mehreren Studien thematisiert wurde [Tschoppe et al., 2011, Poggio et al., 2010]. Die Präsenz von HA-Kristallen sowohl bei den geputzten als auch bei ungeputzten PK belegt die hohe Affinität von HA zur Zahnoberfläche [Li et al., 2008]. Der genaue mikrobielle Wirkmechanismus für HA kann in dieser Studie nicht geklärt werden. Ebenfalls bedarf es weiteren Untersuchungen, ob der Biofilm inhibierende Effekt auf den geputzten PK auf das Vorhandensein von HA zurückzuführen ist oder ob die Menge an Siliziumdioxidputzkörper dafür verantwortlich ist.

In der vorliegenden Studie wurde der antibakterielle Effekt von CHX bestätigt. Aufgrund seiner antimikrobiellen Wirkung und hohen Substantivität gilt CHX aktuell als Goldstandard bei

der chemischen Plaquekontrolle. CHX zerstört die Integrität der bakteriellen Zellmembran und führt somit zur Lyse der Zelle [Jones, 1997]. Die Autoren eines 2006 veröffentlichten Reviews kommen zu dem Schluss, dass die antimikrobielle Wirkung von CHX in Zahnpasteformulierungen eingeschränkt ist und deshalb so nicht eingesetzt werden sollte [Kolahi und Soolari, 2006]. Diese Befunde sind jedoch kritisch zu bewerten, da bislang eine CHX-Inkompatibilität nur für Lösungen und nicht für Na-Laurylsulfat-haltige Zahnpasten gefunden wurde. Im Vergleich zu den anderen Zahnpasten (Ausnahme HA-P) zeigten die CHX-Ansätze aufgrund der antimikrobiellen Wirkung des CHX eine geringere bakterielle Besiedelung der geputzten und ungeputzten Dentinoberfläche [Jones, 1997]. In den ungeputzten CHX-Proben waren aber in vereinzelter Tubuli Bakterien zu erkennen, was möglicherweise auf die Schutzfunktion der Tubuli für die Bakterien zurückzuführen ist. Die mikroskopischen Aufnahmen deuten an, dass CHX eher auf den Biofilm als auf die initiale Pellikelschicht wirkt. Denkbar ist aber auch, dass CHX die Oberfläche der Pellikel so verändert, dass eine Bakterienadhärenz verhindert wird [Hannig und Joiner, 2006]. Der genaue Mechanismus kann durch diese Studie nicht evaluiert werden. In einigen Langzeitstudien kam es bei der Anwendung von CHX-haltigen Mundspüllösungen und Zahnpasten zu Zungenverfärbungen, was die Compliance der Probanden potentiell einschränkt [Claydon et al., 2006]. Dies konnte bei diesen Probanden nicht beobachtet werden. Die alleinige Wirkung von Al auf die Vitalität der Bakterien und die Biofilmneubildung konnte in dieser Studie nur durch die Versuche der A-P getestet werden, da in dieser Zahnpasteformulierung keine weiteren antimikrobiellen Substanzen zugesetzt waren. Die antimikrobielle Wirkung von Al auf die PK zeigte sich überwiegend auf den geputzten Proben. Dort zeigte sich im Vergleich zu den Versuchsreihen mit Wasser, B-P und H-P eine geringere mikrobielle Besiedelung. Der antimikrobielle Effekt der CHX-P und der A-P war auf den geputzten PK vergleichbar. Auf den ungeputzten PK erwiesen sich die HA-P und die CHX-P der A-P als überlegen. Das Umspülen der PK mit Al-haltiger Zahnpaste hatte keinen nachweisbaren antimikrobiellen Effekt. Ob dieser Effekt der Biofilmreduktion auf das Vorhandensein von Al oder auf den erhöhten Anteil an Putzkörpern in der Zahnpaste zurückzuführen ist kann letztlich in dieser Studie nicht erklärt werden. 1980 wurde bereits den Al-Salzen einen antimikrobiellen Effekt zugeschrieben [Oppermann et al., 1980]. Eine Studie mit ionomeren Füllungsmaterialien belegte die antikariogenen und antibakteriellen Wirkungen von Al-Ionen in den getesteten Füllungsmaterialien [Hayacibara et al., 2003]. Ebenfalls bedarf die Frage welchen antimikrobiellen Anteil Al in der CHX-P und in der HA-P zugeschrieben werden kann weiteren Untersuchungen.

Die H-P, die die niedrigste Fluorid-Konzentration aufwies, zeigte keinen nennenswerten Effekt auf die Biofilmneubildung oder die Vitalität der Bakterien. Die Ergebnisse dieser Versuchsrunde ähnelten denen der B-P. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass pflanzliche Zusatzstoffe keinen messbaren antimikrobiellen Nutzen besitzen und die Plaquebildung kaum verlangsamen.

5.3 Schlussfolgerung

Die vorliegende Studie konnte den Biofilm inhibierenden Effekt von HA auf Dentin bestätigen. Die Wirksamkeit der HA-P bei der Biofilmentfernung konnte ebenfalls in dieser *in situ* Studie erwiesen werden. Es bedarf jedoch weiteren Untersuchungen ob diese Effektivität auf das Vorhandensein von Putzkörpern oder auf den Zusatz von HA zurückzuführen ist. Der Nachweis der HA-Nanopartikeln auf geputzten sowie ungeputzten PK deutet auf eine hohe Affinität zur Dentinoberfläche hin. Ein Materialeintrag von HA in die Dentintubuli konnte bei den meisten PK, die mit der HA- P geputzt wurden oder mit dem Zahnpasta-Speichel-Gemisch in Berührung kamen beobachtet werden. Dieser Eintrag in die Tubuli, sowie die Wirkung der Zahnpastarückstände bedürfen weiterer Untersuchungen.

6 Literaturverzeichnis

- Absi E G, Addy M und Adams D (1992). Dentine hypersensitivity - the effect of toothbrushing and dietary compounds on dentine in vitro: an SEM study. *J Oral Rehabil*, 19, 101–110.
- Aguirre A, Mendoza B, Levine M J, Hatton M N und Douglas W H (1989). In vitro characterization of human salivary lubrication. *Arch Oral Biol*, 34, 675 – 677.
- Al-Mulla A, Karlsson L, Kharsa S, Kjellberg H und Birkhed D (2010). Combination of high-fluoride toothpaste and no post-brushing water rinsing on enamel demineralization using an in-situ caries model with orthodontic bands. *Acta Odontol Scand*, 68, 323–328.
- Amaechi B T, Mathews S M, Ramalingam K und Mensinkai P K (2015). Evaluation of nanohydroxyapatite-containing toothpaste for occluding dentin tubules. *Am J Dent*, 28, 33–39.
- Amaechi B T und van Loveren C (2013). Fluorides and Non-Fluoride Remineralization Systems. *Monogr Oral Sci*, 23, 15–26.
- Anand Sherwood I und Lakshmi Narayanan L (2010). Essentials of Operative Dentistry. JAYPEE.
- Arnold W H, Gröger C, Bizhang M und Naumova E A (2016). Dentin abrasivity of various desensitizing toothpastes. *Head Face Med*, 12, 16.
- Arweiler N, Ausschill T, Donos N und Sculean A (2002). Antibacterial effect of an enamel matrix protein derivative on in vivo dental biofilm vitality. *Clin Oral Investig*, 6, 205–209.
- Baehni P C und Takeuchi Y (2003). Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. *Oral Dis*, 9, 23–29.
- Balzar Ekenbäck S, Linder L E, Sund M L und Lönnies H (2001). Effect of fluoride on glucose incorporation and metabolism in biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *Eur J Oral Sci*, 109, 182–186.
- Barkvoll P und Attramadal A (1989). Effect of nystatin and chlorhexidine digluconate on *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 67, 279 – 281.

- Bennick A, Cannon M und Madapallimattam G (1979). The nature of the hydroxyapatite-binding site in salivary acidic proline-rich proteins. *Biochem J*, 183, 115–126.
- Bergdahl M und Bergdahl J (2000). Low Unstimulated Salivary Flow and Subjective Oral Dryness: Association with Medication, Anxiety, Depression, and Stress. *J Dent Res*, 79, 1652–1658.
- Berney M, Hammes F, Bosshard F, Weilenmann H U und Egli T (2007). Assessment and Interpretation of Bacterial Viability by Using the LIVE/DEAD BacLight Kit in Combination with Flow Cytometry. *Appl Environ Microbiol*, 73, 3283–3290.
- Bertassoni L E, Habelitz S, Kinney J H, Marshall S J und Marshall G W J (2009). Biomechanical perspective on the remineralization of dentin. *Caries Res*, 43, 70–77.
- Bollen C M L, Lambrechts P und Quirynen M (1997). Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: A review of the literature. *Dent Mater*, 13, 258 – 269.
- Boulos L, Prévost M, Barbeau B, Coallier J und R D (1999). LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J Microbiol Methods*, 37, 77 – 86.
- Brännström M, Lindén L Å und Åström A (1967). The Hydrodynamics of the Dental Tubule and of Pulp Fluid. *Caries Res*, 1, 310–317.
- Brex M (1997). Strategies and agents in supragingival chemical plaque control. *Periodontol*, 15, 100–108.
- Brex M, Netuschil L und Hoffmann T (2003). How to select the right mouthrinses in periodontal prevention and therapy. Part II. Clinical use and recommendations. *Int J Dent Hyg*, 1, 188–194.
- Browning W D, Cho S D und Deschepper E J (2012). Effect of a Nano-Hydroxyapatite Paste on Bleaching-Related Tooth Sensitivity. *J Esthet Restor Dent*, 24, 268–276.
- Buddecke E (1981). Biochemische Grundlagen der Zahnmedizin. Walter de Gruyter, 173–175.
- Carlsson J (1997). Bacterial Metabolism in Dental Biofilms. *Adv Dent Res*, 1, 75–80.

- Chalmers N I, Palmer R J, Cisar J O und Kolenbrander P E (2008). Characterization of a Streptococcus sp.-Veillonella sp. Community Micromanipulated from Dental Plaque. *J Bacteriol*, 190, 8145–8154.
- Claydon N C A, Addy M, Adams G, Smith S R, Bosma M L, North M und Moran J (2006). A comparison of two chlorhexidine gel brushing regimens and a conventional toothpaste brushing regimen for the development of tooth staining over a 6-week period. *Int J Dent Hyg*, 4, 183–188.
- Coenye T und Nelis H J (2010). In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *J Microbiol Methods*, 83, 89 – 105.
- Costerton J W (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol*, 41, 435–464.
- Costerton J W (1994). Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol*, 176, 2137–2142.
- Davies A (1973). The mode of action of chlorhexidine. *J Periodontal Res*, 8, 68–75.
- Duckworth R M (2013). Pharmacokinetics in the Oral Cavity: Fluoride and Other Active Ingredients. *Monogr Oral Sci*, 23, 125–139.
- Emilson C G (1994). Potential Efficacy of Chlorhexidine against Mutans Streptococci and Human Dental Caries. *J Dent Res*, 73, 682–691.
- Esser M, Tinschert J und Marx R (1998). Materialkennwerte der Zahnhartsubstanz des Rindes im Vergleich zur humanen Zahnhartsubstanz. *Dtsch Zahnärztl Z*, 53, 713–717.
- Esteves-Oliveira M, Santos N M, Meyer-Lueckel H, Wierichs R J und Rodrigues J A (2017). Caries-preventive effect of anti-erosive and nano-hydroxyapatite-containing toothpastes *in vitro*. *Clin Oral Invest*, 21, 291–300.
- European Food Safety Authority (2008). Safety of aluminium from dietary intake[1] - Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Food Contact Materials (AFC). *EFSA Journal*, 754, 1–34.
- European Food Safety Authority (2013). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fluoride. *EFSA Journal*, 8, 3332.

- Farooq I, Moheet I A und Al Shwaimi E (2015). *In vitro* dentin tubule occlusion and remineralization competence of various toothpastes. *Arch Oral Biol*, 60, 1246–1253.
- Featherstone J D B und Mellberg J R (1981). Relative Rates of Progress of Artificial Carious Lesions in Bovine, Ovine and Human Enamel. *Caries Res*, 15, 109–114.
- Feng J, Cheng L, Zhou X, Xu H, Weir M, Meyer M, Maurer H, Li Q, Hannig M und Rupf S (2015). Influence of mouthrinses on 24- / 48-h bacterial biofilm formation in situ. *Dent Mater*, 8, 992–1002.
- Fiedler H P (1967). Zur Prophylaxe der Zahnfleischentzündungen und Parodontopathien. *Zahnärztliche Welt*, 6, 210–211.
- Flötra L, Gjermo P, Rölla G und Waerhaug J (1971). Side effects of chlorhexidine mouth washes. *Eur J Oral Sci*, 79, 119–125.
- Folwaczny M und Hickel R (2003). Biofilm- Problem oder Perspektive? *Dtsch Zahnärztl Z*, 58, 648–659.
- Forsten L und Karjalainen S (1977). Effect of a Ca(OH)₂ solution and a chlorhexidine based detergent on the microbial activity of human carious teeth. *Acta Odontol Scand*, 35, 275–280.
- Ganss C (2014). Is erosive tooth wear an oral disease? *Monogr Oral Sci*, 25, 16–21.
- Garberoglio R und Brännström M (1976). Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Arch Oral Biol*, 21, 355 – 362.
- Geurtsen W, Hellwig E, Klimek J, Beck J, Benz C, Bertzbach F, Braun A, Gabel S, Kant J M, Kiefner P et al. (2016). Kariesprophylaxe bei bleibenden Zähnen - Grundlegende Empfehlungen. *AWMF-Registernummer: 083-021*.
- Giles A, Claydon N C A, Addy M, Hughes N, Sufi F und West N X (2009). Clinical in situ study investigating abrasive effects of two commercially available toothpastes. *J Oral Rehabil*, 36, 498–507.
- Gjermo P, Bonesvoll P und Rölla G (1974). Relationship between plaque-inhibiting effect and retention of chlorhexidine in the human oral cavity. *Arch Oral Biol*, 19, 1031 – 1034.

- González-Cabezas C, Hara A T, Hefferren J und Lippert F (2013). Abrasivity Testing of Dentifrices- Challenges and Current State of the Art. *Monogr Oral Sci*, 23, 100–107.
- Goodman L S und Gilman A (1955). The Pharmacological Basis of Therapeutics. *Med Prog Technol*, 2, 1032.
- Gristina A G, Naylor P und Myrvik Q (1988). Infections from biomaterials and implants: a race for the surface. *Med Prog Technol*, 14, 205–224.
- Hannig C, Basche S, Burghardt T, Al-Ahmad A und Hannig M (2013). Influence of a mouthwash containing hydroxyapatite microclusters on bacterial adherence in situ. *Clin Oral Investig*, 17, 805–814.
- Hannig C, Follo M, Hellwig E und Al-Ahmad A (2010). Visualization of adherent micro-organisms using different techniques. *J Med Microbiol*, 59, 1–7.
- Hannig C und Hannig M (2009). The oral cavity - a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Investig*, 13, 123–139.
- Hannig C und Hannig M (2010a). Natural enamel wear – A physiological source of hydroxylapatite nanoparticles for biofilm management and tooth repair? *Med Hypotheses*, 74, 670 – 672.
- Hannig C, Hoch J, Becker K, Hannig M und Attin T (2005). Lysozyme activity in the initially formed in situ pellicle. *Arch Oral Biol*, 50, 821 – 828.
- Hannig M (1999). Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. *Clin Oral Investig*, 3, 88–95.
- Hannig M und Hannig C (2007). Der initiale orale Biofilm - pathogen oder protektiv? *Oralprophylaxe & Kinderzahnheilkunde*, 29, 73–82.
- Hannig M und Hannig C (2010b). Nanomaterials in preventive dentistry. *Nat Nanotechnol*, 5, 565–569.
- Hannig M und Joiner A (2006). The Structure, Function and Properties of the Acquired Pellicle. *Monogr Oral Sci*, 19, 29–64.

- Harald L und Schiøtt R C (1970). The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *J Periodontal Res*, 5, 79–83.
- Harald L, von der Fehr F R und Schiøtt R C (1972). Inhibition of experimental caries by plaque prevention. *Eur J Oral Sci*, 80, 1–9.
- Hay D I (1973). The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite. *Arch Oral Biol*, 18, 1517 – 1529.
- Hayacibara M F, Rosa O P S, Koo H, Torres S A, Costa B und Cury J A (2003). Effects of Fluoride and Aluminum from Ionomeric Materials on *S. mutans* Biofilm. *J Dent Res*, 82, 267–271.
- Hellwig E, Klimek J und Attin T (2013). Einführung in die Zahnerhaltung. Deutscher Ärzte-Verlag GmbH.
- Hellwig E, Klimek J und Wagner H (1987). The Influence of Plaque on Reaction Mechanism of MFP and NaF in vivo. *J Dent Res*, 66, 46–49.
- Heyden G (1973). Relation between locally high concentration of chlorhexidine and staining as seen in the clinic. *J Periodontal Res*, 8, 76–80.
- Hoyo K, Nagaoka S, Ohshima T und Maeda N (2009). Bacterial Interactions in Dental Biofilm Development. *J Dent Res*, 88, 982–990.
- Huang S B, Gao S S und Yu H Y (2009). Effect of nano-hydroxyapatite concentration on remineralization of initial enamel lesion in vitro. *Biomed Mater*, 4, 1–6.
- Järvinen H, Pienihäkkinen K, Huovinen P und Tenovuo J (1995). Susceptibility of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* to antimicrobial agents after short-term oral chlorhexidine treatments. *Eur J Oral Sci*, 103, 32–35.
- Jayaraman A und Wood T K (2008). Bacterial Quorum Sensing: Signals, Circuits, and Implications for Biofilms and Disease. *Annu Rev Biomed Eng*, 10, 145–167.
- Jena A und Shashirekha G (2015). Comparison of efficacy of three different desensitizing agents for in-office relief of dentin hypersensitivity: A 4 weeks clinical study. *J Conserv Dent*, 18, 389–393.

- Jenkins S, Addy M und Newcombe R G (1994). A comparison of cetylpyridinium chloride, triclosan and chlorhexidine mouthrinse formulations for effects on plaque regrowth. *J Clin Periodontol*, 21, 441–444.
- Jones C G (1997). Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontol*, 15, 55–62.
- Jung D J, Al-Ahmad A, Follo M, Spitzmüller B, Hoth-Hannig W, Hannig M und Hannig C (2010). Visualization of initial bacterial colonization on dentine and enamel in situ. *J Microbiol Methods*, 81, 166 – 174.
- Kim K N, Park Y D, Jeong S H, Jang S O, Kwon H K und Kim B I (2006). Remineralization Potential of New Toothpaste Containing Nano-Hydroxyapatite. *Key Engineering Materials*, 309, 537–540.
- Klimek J, Schlüter N, Dietz C und Ganß C (2010). Zur wissenschaftlichen Effizienz von Nano-Hydroxylapatit in Zahnpasten. *zm*, 7, 60–64.
- Kodaka T, Kobori M, Hirayama A und Abe M (1999). Abrasion of human enamel by brushing with a commercial dentifrice containing hydroxyapatite crystals *in vitro*. *J Electron Microsc*, 48, 167–172.
- Kolahi J und Soolari A (2006). Rinsing with chlorhexidine gluconate solution after brushing and flossing teeth: a systematic review of effectiveness. *Quintessence Int*, 8, 605–6012.
- Kolenbrander P E (2000). Oral Microbial Communities: Biofilms, Interactions, and Genetic Systems. *Annu Rev Microbiol*, 54, 413–437.
- Kolenbrander P E, Andersen R N, Blehert D S, Egland P G, Foster J S und Palmer Jr R J (2002). Communication among Oral Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66, 486–505.
- Komorowski R, Grad H, Wu X Y und Friedman S (2000). Antimicrobial Substantivity of Chlorhexidine-Treated Bovine Root Dentin. *J Endod*, 26, 315 – 317.
- Laheij A, van Strijp A und van Loveren C (2010). In situ Remineralisation of Enamel and Dentin after the Use of an Amine Fluoride Mouthrinse in Addition to Twice Daily Brushings with Amine Fluoride Toothpaste. *Caries Res*, 44, 260–266.
- Larsen M J und Richards A (2001). The Influence of Saliva on the Formation of Calcium Fluoride–Like Material on Human Dental Enamel. *Caries Res*, 35, 57–60.

- Leal S C, Bittar J, Portugal A, Falcão D P, Faber J und Zanotta P (2010). Medication in elderly people: its influence on salivary pattern, signs and symptoms of dry mouth. *Gerodontology*, 27, 129–133.
- Lelli M, Putignano A, Marchetti M, Foltran I, Mangani F, Procaccini M, Roveri N und Orsini G (2014). Remineralization and repair of enamel surface by biomimetic Zn-carbonate hydroxyapatite containing toothpaste: a comparative in vivo study. *Front Physiol*, 5, 333.
- Li L, Haihua P, Jinhui T, Xurong X, Caiyun M, Xinhua G und Ruikang T (2008). Repair of enamel by using hydroxyapatite nanoparticles as the building blocks. *J Mater Chem A Mater*, 18, 4079–4084.
- Lima T J, Ribeiro C C C, Tenuta L M A und Cury J A (2008). Low-Fluoride Dentifrice and Caries Lesion Control in Children with Different Caries Experience: A Randomized Clinical Trial. *Caries Res*, 42, 46–50.
- Lin S, Zuckerman O, Weiss E I, Mazor Y und Fuss Z (2003). Antibacterial Efficacy of a New Chlorhexidine Slow Release Device to Disinfect Dentinal Tubules. *J Endod*, 29, 416 – 418.
- Linde A und Goldberg M (1993). Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*, 5, 679–728.
- Lippert F (2013). An Introduction to Toothpaste - Its Purpose, History and Ingredients. *Monogr Oral Sci*, 23, 1–23.
- Longbottom C, Ekstrand K und Zero D (2009). Traditional preventive treatment options. *Monogr Oral Sci*, 211, 149–155.
- Mabrouk N, Deffuant G, Tolker-Nielsen T und Lobry C (2010). Bacteria can form interconnected microcolonies when a self-excreted product reduces their surface motility: evidence from individual-based model simulations. *Theory Biosci*, 129, 1–13.
- Marinho V C C, Higgins J, Logan S und Sheiham A (2003). Fluoride toothpastes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev*, 1, 1465–1858.
- Marsh P D (2005). Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol*, 32, 7–15.

- Marsh P D und Bradshaw D J (1995). Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol*, 15, 169–175.
- Marsh P D und Martin M V (2003). Oral Microbiology. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Marshall G W, Marshall S J, Kinney J H und Balooch M (1997). The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent*, 25, 441 – 458.
- Marx A, Backes C, Meese E, Lenhof H P und Keller A (2016). EDISON-WMW: Exact Dynamic Programming Solution of the Wilcoxon–Mann–Whitney Test. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 14, 55 – 61.
- McConnell M D, Liu Y, Nowak A P, Pilch S, Masters J G und Composto R J (2010). Bacterial plaque retention on oral hard materials: Effect of surface roughness, surface composition, and physisorbed polycarboxylate. *J Biomed Mater Res A*, 92A, 1518–1527.
- Meyer-Lueckel H, Wierichs R J, Gninka B, Heldmann P, Dörfer C E und Paris S (2015). The effect of various model parameters on enamel caries lesions in a dose–response model in situ. *J Dent*, 43, 1261 – 1267.
- Meyerowitz C, Featherstone J D B, Billings R J, Eisenberg A D, Fu J, Shariati M und Zero D T (1991). Use of an Intra-oral Model to Evaluate 0.05% Sodium Fluoride Mouthrinse in Radiation-induced Hyposalivation. *J Dent Res*, 70, 894–898.
- Moore W E C und Moore L V H (1994). The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol*, 5, 66–77.
- Moreno E C, Kresak M und Hay D (1982). Adsorption Thermodynamics of Acidic Proline-rich Human Salivary Proteins onto Calcium Apatite. *J Biol Chem*, 257, 2981–2989.
- Moshaverinia A, Ansari S, Moshaverinia M, Roohpour N, Darr J A und Rehman I (2008). Effects of incorporation of hydroxyapatite and fluoroapatite nanobioceramics into conventional glass ionomer cements (GIC). *Acta Biomater*, 4, 432 – 440.
- Najibfard K, Ramalingam K, Chedjieu I und Amaechi B T (2011). Remineralization of early caries by a nano-hydroxyapatite dentifrice. *J Clin Dent*, 22, 1–5.

- Nanci A (2008). Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function. Elsevier Health Sciences.
- Nekrashevych Y und Stösser L (2003). Protective Influence of Experimentally Formed Salivary Pellicle on Enamel Erosion. *Caries Res*, 37, 225–231.
- Netuschil L, Auschill T M, Sculean A und Arweiler N B (2014). Confusion over live/dead stainings for the detection of vital microorganisms in oral biofilms - which stain is suitable? *BMC Oral Health*, 14, 2.
- Nielsen T und Molin S (2000). Spatial Organization of Microbial Biofilm Communities. *Microb Ecol*, 40, 75–84.
- Oesterle L J, Shellhart W C und Belanger G K (1998). The use of bovine enamel in bonding studies. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 114, 514 – 519.
- Øgaard B, Rølla G, Ruben J, Dijkman T und Arends J (1988). Microradiographic study of demineralization of shark enamel in a human caries model. *Eur J Oral Sci*, 96, 209–211.
- Oppermann R V, Rølla G, Johansen J R und Assev S (1980). Thiol groups and reduced acidogenicity of dental plaque in the presence of metal ions in vivo. *Eur J Oral Sci*, 88, 389–396.
- Ørstavik D und Kraus F W (1973). The acquired pellicle: Immunofluorescent demonstration of specific proteins. *J Oral Pathol Med*, 2, 68–76.
- Pearce E I F und Dibdin G H (1995). The Diffusion and Enzymic Hydrolysis of Monofluorophosphate in Dental Plaque. *J Dent Res*, 74, 691–697.
- Pepla E, Besharat L K, Palaia G, Tenore G und Migliau G (2014). Nano-hydroxyapatite and its applications in preventive, restorative and regenerative dentistry: a review of literature. *Ann Stomatol (Roma)*, 5, 108–114.
- Poggio C, Lombardini M, Colombo M und Bianchi S (2010). Impact of two toothpastes on repairing enamel erosion produced by a soft drink: An AFM in vitro study. *J Dent*, 38, 868 – 874.

- Quirynen M und Bollen C M L (1995). The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. *J Clin Periodontol*, 22, 1–14.
- Rathe F, Ausschill T M, Sculean A, Gaudszuhn C und Arweiler N B (2007). The plaque and gingivitis reducing effect of a chlorhexidine and aluminium lactate containing dentifrice (Lacalut aktiv®) over a period of 6 months. *J Clin Periodontol*, 34, 646–651.
- Robinson C, Kirkham J, Percival R, Shore R C, Bonass W A, Brookes S J, Kusa L, Nakagaki H, Kato K und Nattress B (1997). A Method for the Quantitative Site-Specific Study of the Biochemistry within Dental Plaque Biofilms Formed in vivo. *Caries Res*, 31, 194–200.
- Rondeau V, Jacqmin-Gadda H, Commenges D, Helmer C und Dartigues J F (2009). Aluminum and silica in drinking water and the risk of Alzheimer's disease or cognitive decline: findings from 15-year follow-up of the PAQUID cohort. *Am J Epidemiol*, 4, 489 – 496.
- Rose R K (2000). Effects of an anticariogenic casein phosphopeptide on calcium diffusion in streptococcal model dental plaques. *Arch Oral Biol*, 45, 569 – 575.
- Rupf S, Balkenhol M, Sahrhage T O, Baum A, Chromik J N, Ruppert K, Wissenbach D K, Maurer H H und Hannig M (2012). Biofilm inhibition by an experimental dental resin composite containing octenidine dihydrochloride. *Dent Mater*, 28, 974 – 984.
- Rykke M und Sönju T (1991). Amino acid composition of acquired enamel pellicle collected in vivo after 2 hours and after 24 hours. *Eur J Oral Sci*, 99, 463–469.
- Sangnes G (1976). Traumatization of teeth and gingiva related to habitual tooth cleaning procedures. *J Clin Periodontol*, 3, 94–103.
- Sanz M, Serrano J, Iniesta M, Santa Cruz I und Herrera D (2013). Antiplaque and Antigingivitis Toothpastes. *Karger*, 23, 27–44.
- Sanz M, Vallcorba N, Fabregues S, Müller I und Herkströter F (1994). The effect of a dentifrice containing chlorhexidine and zinc on plaque, gingivitis, calculus and tooth staining. *J Clin Periodontol*, 21, 431–437.

- Schüpbach P, Neeser J R, Golliard M, Rouvet M und Guggenheim B (1996). Incorporation of Caseinoglycomacropeptide and Caseinophosphopeptide into the Salivary Pellicle Inhibits Adherence of Mutans Streptococci. *J Dent Res*, 75, 1779–1788.
- Smith A M V und Bowen W H (2000). The Effects of Milk and Kappa-Casein on Salivary Pellicle Formed on Hydroxyapatite Discs in situ. *Caries Res*, 34, 88–93.
- Stickler D (1999). Biofilms. *Curr Opin Microbiol*, 2, 270 – 275.
- Stoodley P, de Beer D und Lewandowski Z (1994). Liquid Flow in Biofilm Systems. *Appl Environ Microbiol*, 60, 2711–2716.
- Stoodley P, Dodds I, Boyle J D und Lappin-Scott H M (1998). Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *J Appl Microbiol*, 85, 19S–28S.
- Stookey G K, Burkhard T A und Schemehorn B R (1982). In vitro Removal of Stain with Dentifrices. *J Dent Res*, 61, 1236–1239.
- Tabak L A, Levine M J, Mandel I D und Ellison S A (1982). Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. *J Oral Pathol Med*, 11, 1–17.
- Tawakoli P N, Al-Ahmad A, Hoth-Hannig W, Hannig M und Hannig C (2013). Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm. *Clin Oral Investig*, 17, 841–850.
- Tenuta L M A und Cury J A (2013). Laboratory and Human Studies to Estimate Anticaries Efficacy of Fluoride Toothpastes. *Monogr Oral Sci*, 23, 108–124.
- Tschoppe P, Zandim D L, Martus P und Kielbassa A M (2011). Enamel and dentine remineralization by nano-hydroxyapatite toothpastes. *J Dent*, 39, 430 – 437.
- Van Der Weijden F und Slot D E (2011). Oral hygiene in the prevention of periodontal diseases: the evidence. *Periodontol*, 55, 104–123.
- van Rijkom H M, Truin G J und van't Hof M A (1996). A Meta-analysis of Clinical Studies on the Caries-inhibiting Effect of Chlorhexidine Treatment. *J Dent Res*, 75, 790–795.

- Vassilakos N, Arnebrant T und Glantz P O (1993). An in vitro study of salivary film formation at solid/liquid interfaces. *Eur J Oral Sci*, 101, 133–137.
- Vassilakos N, Arnebrant T, Rundegren J und Glantz P O (1992). In vitro interactions of anionic and cationic surfactants with salivary fractions on well-defined solid surfaces. *Acta Odontol Scand*, 50, 179–188.
- Venegas S C, Palacios J M, Apella M C, Morando P J und Blesa M A (2006). Calcium Modulates Interactions between Bacteria and Hydroxyapatite. *J Dent Res*, 85, 1124–1128.
- Wannemacher M (1964). Studien über die Einwirkungen von Zahnpflegemitteln auf die Gingiva und die Mundschleimhaut nach zytologischen Untersuchungen. *Das deutsche Zahnärzteblatt*, 14, 413–418.
- Watnick P und Kolter R (2000). Biofilm, City of Microbes. *J Bacteriol*, 182, 2675–2679.
- Wimpenny J W (1982). Responses of microorganisms to physical and chemical gradients. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 297, 497–515.
- Yao Y, Lamkin M S und Oppenheim E G (1999). Pellicle Precursor Proteins: Acidic Proline-rich Proteins, Statherin, and Histatins, and their Crosslinking Reaction by Oral Transglutaminase. *J Dent Res*, 78, 1696–1703.
- Yates R, Jenkins S, Newcombe R, Wade W, Moran J und Addy M (1993). A 6-month home usage trial of a 1% chlorhexidine toothpaste. *J Clin Periodontol*, 20, 130–138.
- Zahradnik R T, Moreno E C und Burke E J (1976). Effect of Salivary Pellicle on Enamel Subsurface Demineralization In Vitro. *J Dent Res*, 55, 664–670.
- Zahradnik R T, Propas D und Moreno E C (1977). In Vitro Enamel Demineralization by *Streptococcus mutans* in the Presence of Salivary Pellicles. *J Dent Res*, 56, 1107–1110.
- Zahradnik R T, Propas D und Moreno E C (1978). Effect of Salivary Pellicle Formation Time on In Vitro Attachment and Demineralization by *Streptococcus mutans*. *J Dent Res*, 57, 1036–1042.
- Zantner C und Kielbassa A M (2002). Wie wirksam sind Weißmacher-Zahnpasten? *Oralprophylaxe*, 24, 23–29.

7 Publikation / Danksagung

7.1 Publikation

Ein Teil der Ergebnisse wurde bereits 2014 auf dem ORCA Congress vorgestellt. Publiziert wurden Teile der Ergebnisse in der wissenschaftlichen Fachzeitschrift *Caries Research* 2014;48:442.

7.2 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Stefan Rupf, Oberarzt der Klinik für Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes. Ich danke ihm für die Bereitstellung meines Themas, sowie für seine Hilfsbereitschaft, Freundlichkeit und Unterstützung, die er mir stets entgegenbrachte.

Dem Projektleiter Prof. Dr. Matthias Hannig, Direktor der Klinik für Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes, danke ich für seine Bereitschaft, auch schwierige Fragen zu erörtern.

Vera Sommer und Quian Li gilt ein großer Dank, da Sie die Versuchsreihen mit mir zusammen durchgeführt haben.

Dr. Natalia Umanskaya danke ich für ihre große Unterstützung und Geduld bei den Laborarbeiten.

Herrn Norbert Pütz danke ich für seine geduldige Unterstützung bei den Arbeiten am REM.

Für die Herstellung der Tiefziehschienen möchte ich mich bei Frau Stillenmunkes bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei der Firma Dr. Theiss Naturwaren GmbH, Homburg/Saar, für die Bereitstellung von experimentellen und im Handel verfügbaren Zahnpasten nach unseren Vorgaben.

Ein weiterer Dank geht an Denis Riegelmann, der mir bei der Formatierung sowie bei der Erstellung des Literaturverzeichnisses eine große Hilfe war.

Bedanken möchte ich mich natürlich auch bei den verlässlichen Probanden, die mit großer Geduld und Zuverlässigkeit diese Arbeit möglich gemacht haben.

Auch meinem Freund Marc Schweitzer möchte ich danken. Er hat meine Launen und Verzweiflung stets mit mir getragen und war mein Fels in der Brandung.

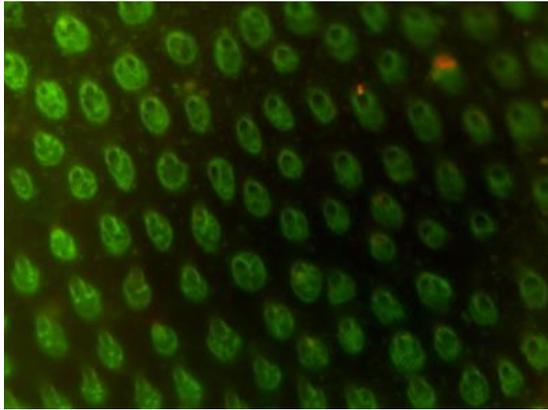
Zuletzt möchte ich mich bei meinen liebevollen Eltern, meiner Schwester und meiner Familie bedanken, die mir diese Dissertation erst ermöglichten. Ohne ihre Hilfe und moralische Unterstützung wäre meine Approbation als Zahnärztin nicht möglich gewesen.

Anhang

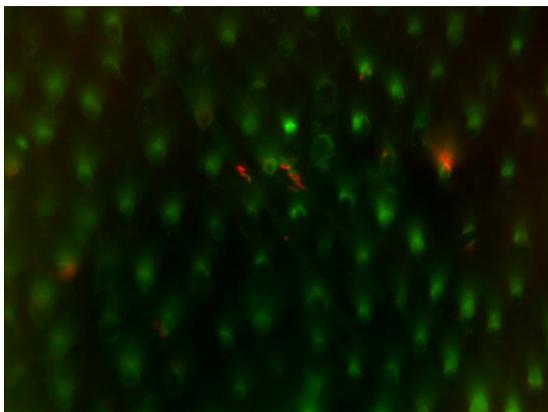
Abkürzungsverzeichnis

Abb.:	Abbildung
Al:	Aluminium
A-P:	Abrasiv-Paste
Aqua dest:	destilliertes Wasser
B-P:	Basispaste
BSE:	Bovine spongiforme Enzephalopathie
CHX:	Chlorhexidin
CHX-P:	Chlorhexidin-Paste
EDX:	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
EPS:	Extrazelluläre Polysaccharide
F:	Fluorid
Gew.-%:	Gewichtsprozent
HA:	Hydroxylapatit
HA-P:	Hydroxylapatit-Paste
HMDS:	Hexamethyldisilazan
H-P:	Kräuterextraktpaste
IgA:	Immunglobulin A
Na:	Natrium
PEG-32:	Polyethylenglykol 32
PK:	Prüfkörper
RDA:	Radioactive-Dentin-Abrasion-(Wert)
REM:	Rasterelektronenmikroskop
S:	<i>Streptococcus</i>
SiO₂:	Siliziumdioxid
Tab.:	Tabelle
TiO₂:	Titandioxid
W:	Wasser

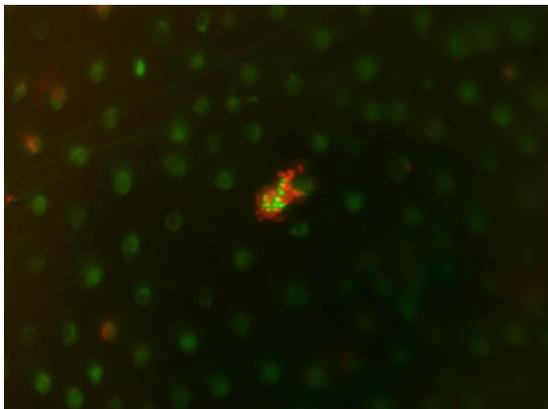
Scoring aus Abbildung 5



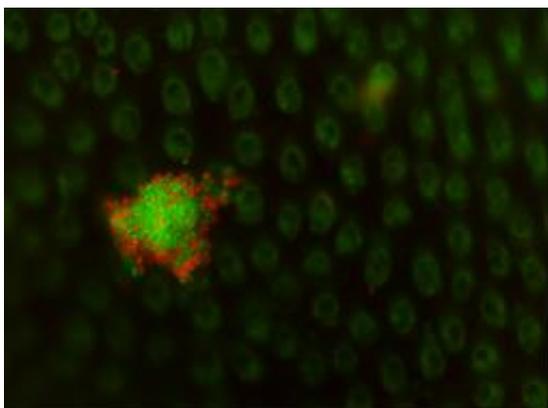
Score 0:
Keine Bakterien



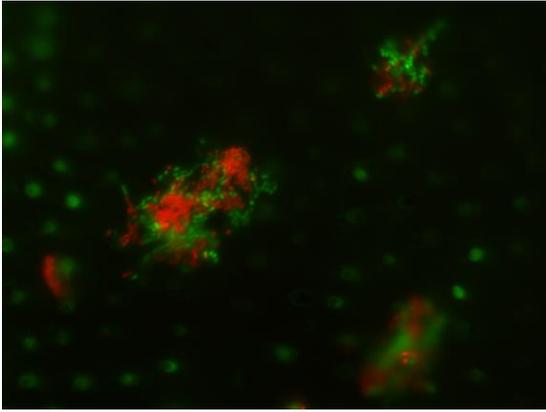
Score 1:
Einzelne Bakterien/
Mikroorganismen



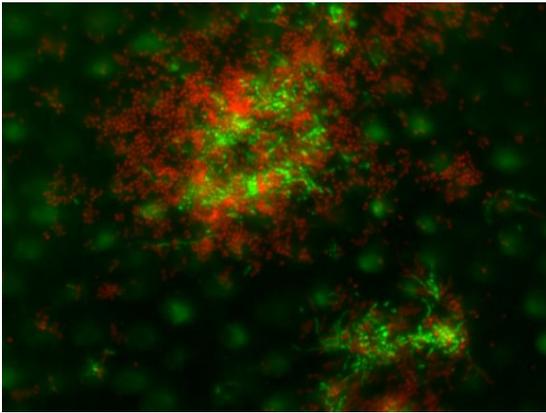
Score 2:
Kleine Bakterienkolonie,
dutzende Bakterien



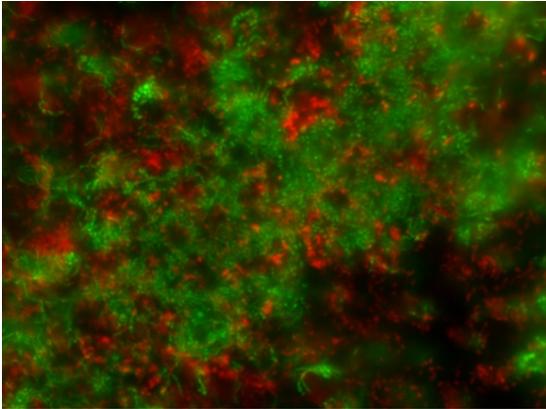
Score 3:
Bakterienkolonie bis hunderte Bakterien



Score 4:
Multiple Bakterienkolonien,
>50 % der Fläche ist Biofilm

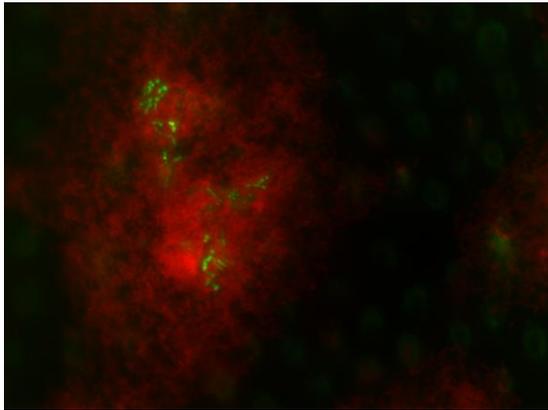


Score 5:
Multiple Bakterienkolonien,
<50 % der Fläche ist Biofilm



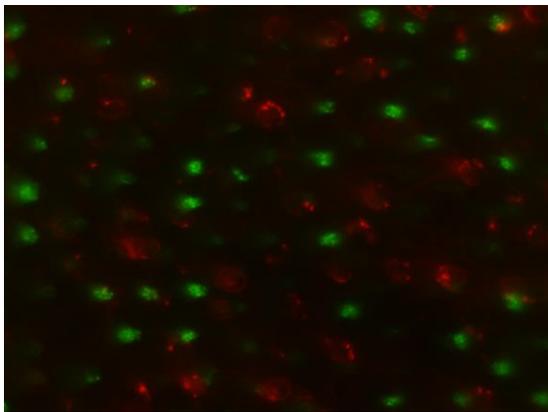
Score 6:
Multilayer Bakterien,
<90 % der Fläche ist Biofilm

Scoring aus Abbildung 6



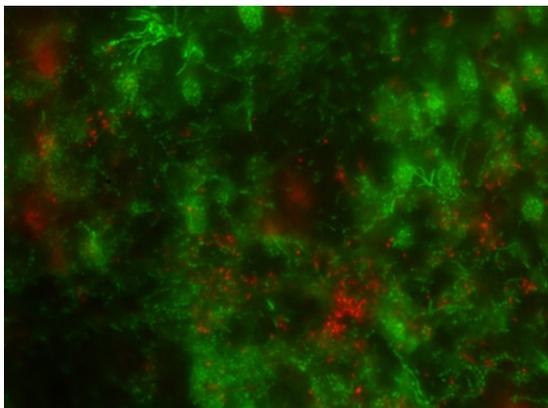
Score 1:

Überwiegend tote Bakterien



Score 2:

Gleich viele tote und lebende Bakterien



Score 3:

Überwiegend lebende Bakterien

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Überblick über den Versuchsaufbau der Studie.	18
Abb. 2:	Schematische Darstellung der Sägeschnitte zur Prüfkörpergewinnung.	20
Abb. 3:	Schematische Darstellung der Prüfkörperanordnung auf den Trageschienen.	21
Abb. 4:	Beispiel einer Prüfkörpertrageschiene	21
Abb. 5:	Scoring zur Beurteilung der Biofilmmenge auf der Dentinoberfläche (Bildvergrößerung siehe Anhang).	26
Abb. 6:	Scoring zur Beurteilung der Vitalität der Bakterien (Bildvergrößerung siehe Anhang).	27
Abb. 7:	Eigenfluoreszenz der Dentintubuli: (a) HA-P geputzt, geätzt, (b) CHX-P geputzt poliert, PK mit Eigenfluoreszenz und Zahnpastarückständen in den Dentintubuli (fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen). Grün vitale Bakterien; Rot: avitale Bakterien. Original Vergrößerung 1000-fach.	29
Abb. 8:	Anordnung der Bakterien im 24-h-Biofilm: Vereinzelte Bakterien (a-b), Ketten (c-d) und Kolonien (e-f); (a und b) CHX-P geputzt, (c) A-P geputzt, (d) H-P geputzt, (e) HA-P ungeputzt, (f) Wasser ungeputzt (fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen). Grün vitale Bakterien; Rot: avitale Bakterien. Original Vergrößerung 1000-fach.	30
Abb. 9:	Gegenüberstellung der Medianwerte der Biofilmbildung zwischen geputzten/ ungeputzten PK (blaue Boxplot-Balken); geputzt, polierten/ geputzt ,geätzten PK (orange Boxplot-Balken), sowie ungeputzt, polierten und ungeputzt geätzten PK (grüner Boxplot-Balken). Signifikante Unterschiede wurden mit * gekennzeichnet($p < 0,05$). Die ungeputzten PK (geätzt/ poliert) wiesen keine signifikante Unterschiede auf. Score 0: Keine Bakterien, Score 1: Einzelne Bakterien/ Mikroorganismen, Score 2: Kleine Bakterienkolonien, dutzende Bakterien, Score 3: Bakterienkolonien, bis hunderte Bakterien. Score 4: Multiple Bakterienkolonien, <50 % der Fläche von Biofilm bedeckt, Score 5: Multiple Bakterienkolonien, >50 % der Fläche von Biofilm bedeckt, Score 6: Multilayer Bakterien >90 % der Fläche ist Biofilm (s. Abb. 5)	32
Abb. 10:	Biofilmbildung nach 24 h auf den ungeputzten (oben) und geputzten (unten), geätzten sowie polierten PK nach dem Scoring von Abb. 5.	33

Abb. 11:	Vermehrte Bakterienaggregation in den Dentintubuli auf der geätzten Seite der PK: (a) Wasser ungeputzt, geätzt, (b) A-P ungeputzt, geätzt (fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen). Grün vitale Bakterien; Rot: avitale Bakterien. Original Vergrößerung 1000-fach.	34
Abb. 12:	Gegenüberstellung der Biofilmbildung nach 24 h auf den geputzten (a, c, e, g) und den ungeputzten PK (b, d, f, h) der getesteten Zahnpasten: (a und b) HA-P, (c + d) CHX-P, (e + f) H-P, (g + h) A-P. Grün: lebende Bakterien; rot: tote Bakterien (fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen). Grün vitale Bakterien; Rot: avitale Bakterien. Original Vergrößerung 1000-fach.	35
Abb. 13:	Gegenüberstellung der Biofilmbildung nach 24 h auf den geputzten (a, c) und den ungeputzten PK (b, d) der Kontrollgruppe Wasser und der B-P: (a und b) B-P, (c + d) Wasser (fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen). Grün vitale Bakterien; Rot: avitale Bakterien. Original Vergrößerung 1000-fach.	36
Abb. 14:	Gegenüberstellung der Medianwerte der ungeputzt, polierten gegen die ungeputzt geätzten PK. Es konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Score 1: Überwiegend tote Bakterien, Score 2: Vergleichbar viele tote und lebende Bakterien, Score 3: Überwiegend lebende Bakterien (s. Abb. 6).	38
Abb. 15:	Vitalität der Mikroorganismen im Biofilm auf den ungeputzten PK. Score 1: Überwiegend tote Bakterien, Score 2: Vergleichbar viele tote und lebende Bakterien, Score 3: Überwiegend lebende Bakterien (s. Abb. 6).	39
Abb. 16:	Vitalität der Bakterien im Biofilm auf den ungeputzten, geätzten sowie polierten PK. Score 1: Überwiegend tote Bakterien, Score 2: Vergleichbar viele tote und lebende Bakterien, Score 3: Überwiegend lebende Bakterien (s. Abb. 6).	39
Abb. 17:	Ungeputzte PK mit 24 h <i>in situ</i> Biofilm der Kontrolle (Wasser): (a + b) geätzter PK mit überwiegend Kokken und nur vereinzelt Stäbchen, (c) geätzter PK mit mehrschichtig organisiertem Biofilm, (d) polierter PK mit mehrschichtig organisiertem Biofilm, (e) geätzter PK: Biofilm mit aufgelagerten Kokken und Stäbchen, (f) polierter PK mit Stäbchen und Kokken in den Dentintubuli und auf der Dentinoberfläche, (REM-Aufnahmen). Originalvergrößerung (a, b, e, f) 5000-fach; (c + d) 2000-fach.	41
Abb. 18:	24 h <i>in situ</i> Biofilm auf ungeputzten PK; Ablage der Mikroorganismen (grüner Pfeil) und Zahnpastarückständen (blauer Pfeil) in den Tubuli und auf der Dentinoberfläche: (a + b) HA-P, (c + d) CHX-P. Originalvergrößerung (b + c) 2000-fach; (a + d) 5000-fach.	42

Abb. 19:	Zahnpastarückstände der HA-Paste auf der geputzten Dentinoberfläche und in den Dentintubuli in 2000-, 5000-, und 10000-facher Vergrößerung: geätzte PK (b, d + e); polierte PK (a + c) (REM-Aufnahmen). Originalvergrößerung (a + b) 2000-fach, (c + d) 5000-fach, (e) 10000-fach.	43
Abb. 20:	Darstellung der Siliziumdioxid-Putzkörper (Pfeil), die in EDX-Untersuchungen als solche verifiziert wurden (vergleiche Abbildung 24a + b; 25. (a) HA-P ungeputzt, poliert; (b) A-P ungeputzt, poliert; (c) A-P geputzt, geätzt (REM-Aufnahmen). Originalvergrößerung 5000-fach.	44
Abb. 21:	Gegenüberstellung der Biofilmneubildung nach 24 h auf den geputzten (a, c, e, g) und ungeputzten PK (b, d, f, h) der getesteten Zahnpasten: (a + b) HA-P; (c + d) CHX-P; (e + f) A-P; (g + h) H-P (REM-Aufnahmen). Originalvergrößerung (a, b, c, d, f, g, h) 2000-fach, (e) 1000-fach.	46
Abb. 22:	Gegenüberstellung der Biofilmneubildung nach 24 h auf den geputzten (a + c) und den ungeputzten PK (b + d) der Negativkontrolle Wasser und der Testpaste B-P: (a + b) Wasser; (c + d) B-P (REM-Aufnahmen). Originalvergrößerung 2000-fach.	47
Abb. 23:	EDX-Aufnahmen der PK die mit Wasser und B-P geputzt wurden: (a) Wasser geputzt, Ausschnittsanalyse, (b) B-P geputzt, Punktanalyse. Das Si-Signal (b) lässt Siliziumdioxid-Putzkörper vermuten.	49
Abb. 24:	EDX-Aufnahmen (Punktanalyse) von ungeputzten Dentin-PK. (a) HA-P, (b) A-P. Siliziumdioxid-Putzkörper konnten in beiden Pasten detektiert werden. Die Putzkörper waren nicht nur auf den geputzten Dentinoberflächen (s. Abb. 25), sondern auch auf den ungeputzten PK nachweisbar.	50
Abb. 25:	EDX-Aufnahmen von Siliziumdioxid-Putzkörpern auf der geputzten Dentinoberfläche, sowie in Zahnpastarückständen. Geringer Nachweis von Al auf den PK der HA-P und der A-P: (a) HA-P, (b) A-P.	51
Abb. 26:	EDX-Aufnahmen von Dentin-PK, die mit der CHX-P geputzt wurden. Die Ausschnittsanalyse (a) und die Punktanalyse (b) dienen dem Nachweis von Al auf der Dentinoberfläche (hier a: 2,1 Gew.-%; b: 10,64 Gew.-%).	52
Abb. 27:	EDX-Analyse (Punktanalyse) eines Dentin-PK, der mit der HA-P geputzt wurde. In dieser Punktanalyse sind Calcium (hier 84,35 Gew.-%) und Phosphat (hier 6,95 Gew.-%) die dominierenden Elemente. HA konnte nicht nur in den Dentintubuli, sondern auch auf Pellikel bedeckter Oberfläche nachgewiesen werden (s. Abb. 29).	53

Abb. 28: EDX-Analysen von mit HA-P geputzten PK. Elementanalyse der kompletten Dentinoberfläche zum Nachweis von HA (a + b). Auch hier können Calcium (a: 25,57 Gew.-%; b: 23,02 Gew.-%) und Phosphat (a: 14,13 Gew.-%; b: 12,58 Gew.-%) detektiert werden. 54

Abb. 29: EDX-Analysen der ungeputzten Dentin-PK die mit der HA-P umspült wurden. Punktanalysen zum Nachweis von HA auf der ungeputzte Seite (a + b). Auch bei diesen PK sind Calcium (a: 25,26 Gew.-%; b: 21,6 Gew.-%) und Phosphat (a: 12,83 Gew.-%; b: 11,85) in vergleichbarer Menge detektierbar. 55

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Inhaltsstoffe der verwendeten Zahnpasten.	22
Tab. 2:	Fixierung der PK für die Rasterelektronenmikroskopie.	28